



**Universidad Autónoma de Madrid  
Facultad de Ciencias  
Departamento de Biología Molecular**

***El peptidoma en enfermedades asociadas a  
antígenos de MHC-I. Mimetismo molecular entre  
ligandos de HLA-B\*27 en artritis reactiva e  
interacción funcional de ERAP1 y HLA-A\*29 en la  
retinopatía en perdigonada***

*Memoria para optar al grado de Doctor por la  
Universidad Autónoma de Madrid*

***Carlos Eduardo Alvarez Navarro***

**Marzo**

**2015**





*A mis papás ...  
por enseñarme a volar*



*La única ley verdadera es aquella que conduce a la libertad*  
*Juan Salvador Gaviota*  
*(Richard Bach)*

*Justifica tus limitaciones y ciertamente las tendrás*  
*Ilusiones (Richard Bach)*





Universidad Autónoma de Madrid  
Facultad de Ciencias  
Departamento de Biología Molecular

***El peptidoma en enfermedades asociadas a  
antígenos de MHC-I. Mimetismo molecular entre  
ligandos de HLA-B\*27 en artritis reactiva e  
interacción funcional de ERAP1 y HLA-A\*29 en la  
retinopatía en perdigonada***

*Memoria para optar al grado de Doctor por la  
Universidad Autónoma de Madrid*

***Carlos Eduardo Alvarez Navarro***

***Director***

***Dr. José Antonio López de Castro Álvarez***  
*Profesor de Investigación C.S.I.C*  
*Centro de Biología Molecular Severo Ochoa*

***Tutor***

***Dra. Núria Gironès Pujol***  
*Profesor Contratado Doctor*  
*Centro de Biología Molecular Severo Ochoa*

**Marzo  
2015**



## SUMMARY

MHC-I molecules, some of which are strongly associated with autoimmune diseases, present peptides at the cell surface for recognition by T cells, two mechanisms might implicate MHC-bound peptides as a key pathogenetic component in these disorders. The first one involves the presentation of pathogen-derived peptides. The homology among pathogen and self-derived MHC-I-restricted epitopes can promote autoimmune T-cell cross-reactions, tissue injury and inflammation. The second one involves general alterations of the peptidome, capable to alter general features of the MHC-I molecule, such as folding and stability, and to increase its pro-inflammatory potential.

Reactive arthritis (ReA) is an inflammatory disease linked to HLA-B\*27, which has *C. trachomatis* as one of the major pathogenetic agents. In this study we addressed the endogenous processing and presentation by HLA-B\*27 of several *Chlamydia*-derived peptides. Novel HLA-B27-restricted *Chlamydial* epitopes with high homology to human sequences were found. Among them, NQRA(330-338) was the second bacterial epitope recognized by CTLs from patients with ReA whose endogenous processing and presentation in live cells was demonstrated. Another peptide, DNAP(211-223), showed high sequence homology with a natural human-derived HLA-B\*27 ligand, B27(309-320). Molecular dynamics simulations showed that both peptides adopted relatively similar conformations, although the chlamydial peptide was much less flexible. In further collaborative studies, T-cell cross-reaction between both peptides was demonstrated. These results reveal the occurrence of molecular and antigenic mimicry between HLA-B\*27 ligands from arthritogenic bacteria and from human proteins, suggesting that this mechanism may play a role in the pathogenesis of ReA or in its evolution to chronic disease.

Birdshot chorioretinopathy (BSCR) is very strongly associated with HLA-A\*29:02. ERAP1, an enzyme that trims peptides to their optimal size for MHC-I binding, is a susceptibility factor in other MHC-I-associated diseases and is usually in epistasis with the susceptibility MHC-I alleles. The possible pathogenetic role of ERAP1 in BSCR was investigated by analyzing the A\*29:02 peptidome from cell lines carrying different ERAP1 variants with polymorphisms associated with other diseases. ERAP1 profoundly affected the A\*29:02 peptidome at four levels: 1) peptide length, 2) peptide affinity, 3) volume of peptide residues, and 4) peptide hydrophobicity. These alterations go beyond possible effects of ERAP1 on specific antigen presentation, since they may affect other features of HLA-A\*29:02, such as molecular stability, pro-inflammatory potential and recognition by NK cells.





**ABREVIATURAS**

A	Amperios
aa	Aminoácido
AMU	<i>Atomic Mass Units</i>
APBS	<i>Adaptive Poisson-Boltzmann Solver</i>
APC	Célula Presentadora de Antígeno
AS	Espondilitis Anquilosante
ATP	Trifosfato de Adenosina
$\beta_2m$	$\beta_2$ -microglobulina
BSCR	Retinopatía en perdigonada
CID	<i>Collision-induced dissociation</i>
ClpC	<i>CLP protease ATP-binding subunit C</i>
CTL	Linfocito T Citotóxico
Da	Dalton
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DNAP	DNA primasa
DRiPs	Productos Defectivos de la Síntesis Ribosomal
ERAP	Aminopeptidasa del Retículo Endoplasmático
ERp57	Oxidoreductasa ERp57
ESI	<i>Electrospray Ionization</i>
F	Faradios
FBS	Suero Fetal Bovino
FDR	<i>False Discovery Rate</i>
FR	Frecuencia Relativa
GFP	<i>Green Fluorescent Protein</i>
GRAVY	<i>Grand average of hydropathicity</i>
HC	Cadena Pesada
HCD	<i>High-energy Collision Dissociation</i>
HEPES	Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazina etano sulfónico
HLA	Antígenos Leucocitarios Humanos
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
ICS	<i>Immunoproteasome Cleavage Score</i>
IFN	Interferón
LD	Desequilibrio de Ligamiento
LNPEP	<i>Leucyl/cystinyl aminopeptidase</i>
MALDI	<i>Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization</i>
MD	Dinámica Molecular
MHC	Complejo Mayor de Histocompatibilidad
MS	Espectrometría de Masas
MS/MS	Espectrometría de Masas en Tandem
MW	Peso Molecular
NK	<i>Natural Killer</i>
NMD	<i>Nonsense-mediated decay</i>
NQRA	<i>Na(+)-translocating NADH-quinone reductase subunit A</i>
PBS	Tampón Salino de Fosfato

PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
PCS	<i>Proteasome Cleavage Score</i>
PLC	Complejo de Carga peptídica
PqqC	<i>Pyrroloquinoline-quinone synthase-like protein</i>
PSM	<i>Peptide Spectrum Match</i>
RE	Retículo Endoplásmico
ReA	Artritis Reactiva
reps	Estructuras Representantes
RI	Relación de Intensidad
RMSD	<i>Root mean square deviation</i>
RMSF	<i>Root mean square fluctuation</i>
rt	Tiempo de Retención
SMIM	<i>Selected multiple ion monitoring</i>
SNP	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i>
TAP	Transportador Asociado con el Procesamiento Antigénico
TCR	Receptor de Células T
TFA	Ácido trifluoroacético
Th <sub>17</sub>	Células T helper 17
TNF	Factor de Necrosis Tumoral
TOF	<i>Time of Flight</i>
TOP	Oligopeptidasa Thimet
TPP-II	Tripeptidil peptidasa II
V	Voltios

## **ÍNDICE**



**ÍNDICE**

<b>INTRODUCCIÓN</b>	1
I.1 Estructura de las moléculas de MHC de clase I	3
I.2 Vía de procesamiento y presentación antigénica de MHC-I	5
I.3 Procesamiento antigénico y enfermedades asociadas a MHC-I	7
I.3.1 Antígenos específicos y Artritis Reactiva (ReA)	7
I.3.2 Modulación global del peptidoma y el papel patogénico de HLA-B*27 en la espondilitis anquilosante (AS)	10
I.4 Aminopeptidasas del RE implicadas en el procesamiento de ligandos de MHC-I	11
I.4.1 ERAP1	12
I.4.2 ERAP2	12
I.5 Asociación de ERAP1 y ERAP2 en enfermedades ligadas a MHC-I	14
I.5.1 ERAP1	14
I.5.2 ERAP2	16
I.6 BSCR, ERAP2 y la posible implicación de ERAP1	16
<b>OBJETIVOS</b>	19
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	23
M.1 Construcciones génicas	25
M.2 Generación de transfectantes y cultivos celulares	25
M.3 Caracterización de SNPs de ERAP1 y ERAP2 mediante genotipaje	26
M.4 Anticuerpos	26
M.5 Citometría de flujo	27
M.6 Inmunoprecipitación y Western blot	27
M.7 Aislamiento de péptidos unidos a MHC-I	28
M.8 Espectrometría de Masas (MS)	28
M.8.1 Electrospray-LTQ-Orbitrap MS/MS	28
M.8.2 Electrospray-LTQ-Velos MS/MS	29
M.8.3 Q-Exactive plus MS/MS	30
M.9 Búsqueda en bases de datos	30
M.10 Búsqueda de homología por secuencia y predicción del corte por el proteasoma	31
M.11 Predicción del transporte de ligandos por TAP	31
M.12 Predicción de la afinidad a HLA-A*29:02	31
M.13 Análisis de hidropatía	31
M.14 Simulación dinámica	32
M.14.1 Modelización por homología	32

M.14.2 Preparación de los sistemas y simulaciones de dinámica molecular .....	32
M.14.3 Análisis de las trayectorias de MD. ....	33
<b>RESULTADOS .....</b>	<b>37</b>
<b>RESULTADOS I. ....</b>	<b>37</b>
R.1 ClpC .....	37
R.1.1 Expresión de las proteínas de fusión de ClpC en células C1R-B*27:05.....	37
R.1.2 Un péptido derivado de ClpC distinto del epítipo predicho es procesado endógenamente y presentado por HLA-B*27:05.....	38
R.2 NQRA .....	42
R.2.1 Un péptido derivado de NQRA, reconocido por CTLs de pacientes con ReA, es procesado endógenamente y presentado por HLA-B*27:05. ....	42
R.3 Los péptidos derivados de ClpC y NQRA presentan alta homología de secuencia con péptidos humanos. ....	43
R.4 DNA Primasa .....	45
R.4.1 Un nuevo péptido derivado de DNAP es endógenamente presentado por HLA- B*27:05.....	45
R.5 Conformación de los ligandos de DNAP unidos a HLA-B*27: Estudios de simulación dinámica. ....	47
R.5.1 Los péptidos derivados de DNAP muestran homología conformacional con un péptido endógeno derivado de HLA-B*27.....	47
R.5.2 Los péptidos derivados de DNAP presentan distinta flexibilidad y conformación. ....	47
<b>RESULTADOS II. ....</b>	<b>52</b>
R.6 El peptidoma de HLA-A*29:02 y el efecto de ERAP1 en su configuración. ....	52
R.6.1 Caracterización del peptidoma de HLA-A*29:02.....	52
R.6.2 Afinidad de los ligandos de A*29:02 y sus precursores, por TAP.....	52
R.6.3 Polimorfismos de ERAP1, ERAP2 y expresión de MHC-I en células HLA- A*29:02 positivas. ....	55
R.6.4 Conservación global del peptidoma de A*29:02 en distintos contextos de ERAP1.....	57
R.6.5 ERAP1 tiene una influencia significativa en la longitud de los ligandos de A*29:02.....	58
R.6.6 Diferencias independientes de la longitud en la masa molecular de los ligandos de A*29:02 expresados en distintos contextos de ERAP1. ....	60
R.6.7 Diferencias dependientes de la posición peptídica de los ligandos de A*29:02 en distintos contextos de ERAP1. ....	61
R.6.8 ERAP1 modula la afinidad de los ligandos de A*29:02 mediante efectos dependientes e independientes de la longitud peptídica. ....	63

R.6.9 ERAP1 modula la hidrofobicidad de los ligandos de A*29:02.....	66
<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>69</b>
<b>DISCUSIÓN I.....</b>	<b>71</b>
D.1 Ligandos de HLA-B*27 derivados de <i>C. trachomatis</i> y el papel del mimetismo molecular en la ReA.....	71
D.1.1 Implicaciones del ciclo de vida de <i>Chlamydia</i> para la presentación de antígenos.....	72
D.1.2 Mimetismo molecular.....	72
<b>DISCUSIÓN II.....</b>	<b>75</b>
D.2 El peptidoma de A*29:02, su modulación por ERAP1 y su posible papel patogénico.....	75
D.2.1 El peptidoma de A*29:02.....	75
D.2.2 Efectos de la ausencia de ERAP1 sobre el peptidoma A*29:02.....	76
D.2.3 Efectos de la presencia y polimorfismo de ERAP1.....	76
D.2.4 Mecanismo de acción de ERAP1 en la configuración del repertorio peptídico, independiente de la longitud.....	77
D.2.5 ERAP1 y el papel de ERAP2 como factor de riesgo en BSCR.....	77
<b>DISCUSIÓN GENERAL.....</b>	<b>79</b>
Papel de los péptidos en la patogenia de las enfermedades asociadas a MHC-I.....	79
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>81</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>85</b>
<b>Anexo I.....</b>	<b>103</b>
<b>Anexo II.....</b>	<b>179</b>





# INTRODUCCIÓN



## INTRODUCCIÓN

El sistema inmune es el encargado de vigilar los cambios que se producen en el organismo y de destruir los elementos extraños que hayan ingresado al mismo. Para ello existen dos sistemas que determinan el tipo de respuesta que va a producir. El primero es el sistema inmune innato, compuesto por diversos tipos celulares, como macrófagos, células dendríticas y células *Natural Killer* (NK), y moléculas, como receptores tipo *Toll*, péptidos antibacterianos y el complemento. La respuesta inmune innata es rápida, de amplio espectro y poco específica. El otro sistema inmune se denomina adquirido o específico. Este sistema está constituido principalmente por linfocitos B y T, los primeros encargados de generar anticuerpos contra el elemento extraño y los segundos de producir una respuesta celular, mediada por los linfocitos T citotóxicos (CTLs), produciendo así la destrucción de las células infectadas o transformadas y de regular la respuesta inmune (linfocitos T reguladores). Debido a que esta respuesta requiere la generación de células y moléculas específicas, es más lenta que la producida por el sistema inmune innato.

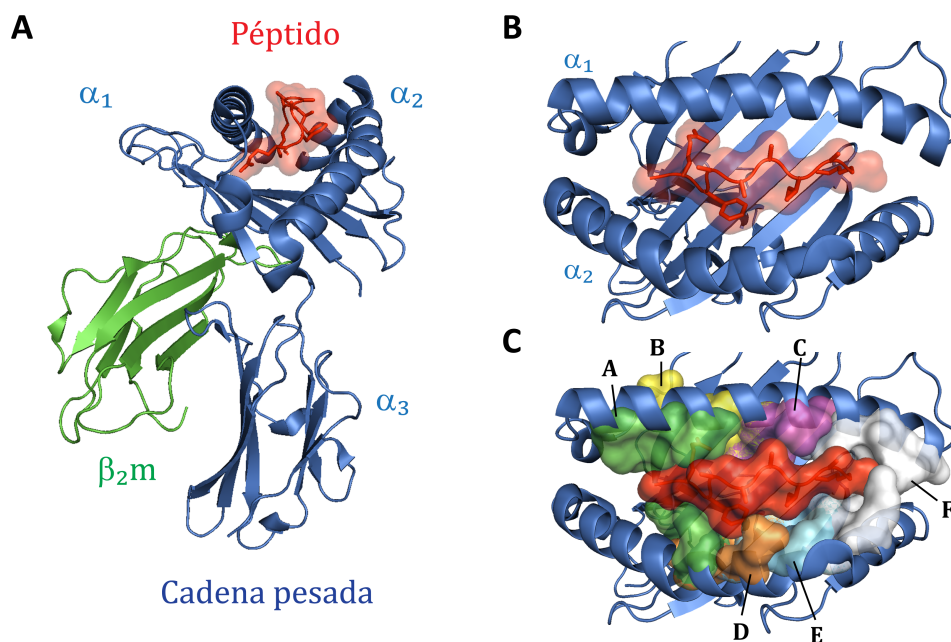
La respuesta celular mediada por los CTLs es dependiente del reconocimiento del antígeno presentado, por parte del receptor de la célula T (TCR). Esta presentación de antígeno es producida por las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad de clase I (MHC-I), que es el encargado de exponer en la superficie de las células el antígeno para ser reconocido. De esta manera, el sistema inmune es capaz de reconocer una célula infectada o que se ha transformado en maligna. La ausencia de esta respuesta contra antígenos “propios” se denomina tolerancia inmunológica. La ruptura de esta tolerancia se conoce como respuesta autoinmune y lleva al sistema inmune a producir un ataque al propio organismo.

### 1.1 Estructura de las moléculas de MHC de clase I.

Las moléculas de MHC-I son glicoproteínas que se expresan en la superficie de todas las células nucleadas y están compuestas por una cadena pesada (HC) de 44 kDa, una cadena ligera o  $\beta_2$ -microglobulina ( $\beta_2m$ ) de 12 kDa y el péptido, que puede tener una longitud variable entre 8 y 14 aminoácidos (aa) (**Figura I1**). La cadena pesada consta de una región extracelular de 274 aa, un segmento transmembrana de 25 aa y una región intracitoplasmática de aproximadamente 30 aa. La molécula completa consta de cuatro dominios: 3 formados por la HC ( $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$  y  $\alpha_3$ ) y uno formado por  $\beta_2m$  (Orr *et al.*, 1979). De estos dominios,  $\alpha_3$  y  $\beta_2m$  se pliegan adquiriendo una conformación similar a los dominios constantes de las inmunoglobulinas. En cambio, los dominios  $\alpha_1$  y  $\alpha_2$  conforman una cavidad compuesta por dos hélices  $\alpha$  superpuestas sobre una lámina  $\beta$  de 8 bandas antiparalelas. En su conjunto esta estructura constituye el sitio de unión de péptido

(Bjorkman *et al.*, 1987a; Bjorkman *et al.*, 1987b; Garrett *et al.*, 1989; Saper *et al.*, 1991; Madden *et al.*, 1992; Madden y Wiley, 1992).

$\beta_2m$  adopta una conformación homóloga a  $\alpha_3$  y establece interacciones con dicho dominio, así como con  $\alpha_1$  y  $\alpha_2$ , lo cual favorece la estabilización de la molécula (Madden, 1995). Además,  $\alpha_3$  interacciona con el receptor CD8 de las células T (Gao *et al.*, 1997). Los dominios  $\alpha_1$  y  $\alpha_2$  de la molécula son altamente polimórficos, lo cual confiere a las distintas moléculas de MHC-I la capacidad de unir conjuntos de péptidos diferentes. La naturaleza de la interacción de los péptidos con el MHC-I viene dada por las cadenas laterales de los residuos que conforman el sitio de unión de péptidos y las del ligando peptídico. Así como por interacciones que implican al esqueleto peptídico y a los grupos N- y C-terminales. Se han identificado una serie de subcavidades o “*pockets*” que interaccionan con determinados residuos peptídicos, las cuales, en su conjunto, determinan la especificidad de unión de la molécula (**Figura I1**) (Garrett *et al.*, 1989; Madden y Wiley, 1992).



**Figura I1: Estructura de las moléculas de MHC-I.** A) Vista lateral del heterotrímero péptido/HC/β<sub>2</sub>m. B) Vista superficial del complejo MHC/péptido. El péptido se encuentra rodeado lateralmente por dos α-hélices y debajo por 8 láminas β antiparalelas. C) Vista superficial del complejo MHC/péptido en la cual se muestran las diferentes subcavidades que participan en la unión del péptido.

La estructura de las subcavidades de cada molécula MHC-I determina, por tanto, el tipo de péptidos que dicha molécula puede unir. Algunas cavidades presentan una selectividad muy alta por determinados residuos, mientras que otras tienen baja restricción. Por lo tanto, una molécula de MHC-I puede unir una inmensa variedad de péptidos que, sin embargo, presentan motivos estructurales específicos. Además, algunos

residuos del ligando no interaccionan con el MHC, o lo hacen marginalmente, quedando expuestos al reconocimiento por el TCR.

## ***1.2 Vía de procesamiento y presentación antigénica de MHC-I.***

Los péptidos presentados por el MHC-I siguen una ruta que parte desde la síntesis de sus proteínas parentales por los ribosomas y termina con su reconocimiento, por parte del TCR, en la superficie celular.

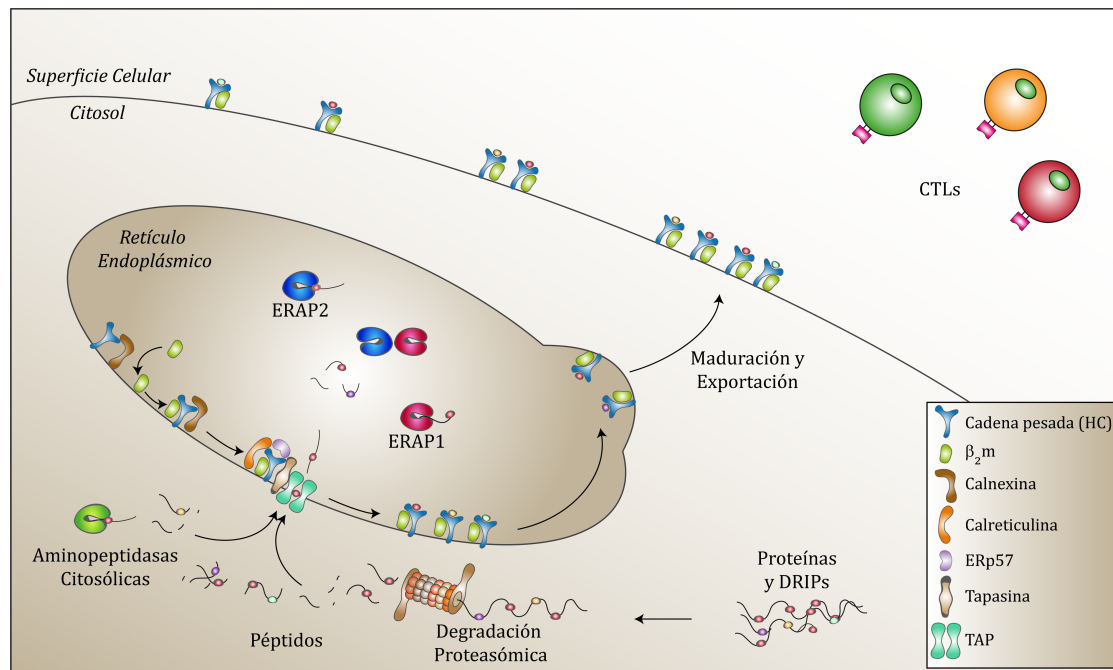
Durante la síntesis de proteínas se pueden producir errores en el proceso de traducción lo cual puede llevar a la generación de formas proteicas aberrantes y no funcionales, que se tienden a acumular y degradar. Estos productos defectivos ribosomales, o DRIPs (*defective ribosomal products*) serían fuente de una cantidad considerable de antígenos (Schubert *et al.*, 2000; Princiotta *et al.*, 2003; Bourdetsky *et al.*, 2014). Otra fuente importante de ligandos proviene de aquellas proteínas destinadas a degradación al final de su vida útil. Tanto los DRIPs como las proteínas que entran en esta fase son degradadas a través de la principal proteasa celular: el proteasoma. Esta proteasa es un complejo multimérico compuesto por una unidad principal, o proteasoma 20S, el cual realiza la actividad catalítica a través de las subunidades  $\beta$ , y una subunidad reguladora o 19S, que en conjunto forman el proteasoma 26S. La participación del proteasoma no solo lleva a la formación de fragmentos de distintos tamaños, sino que es fundamental en la generación del extremo C-terminal de los ligandos de MHC-I (Howard, 1995; Cascio, 2014). Su papel en la configuración primaria del repertorio peptídico es de suma importancia, debido a que bajo condiciones inflamatorias, por ejemplo ante estímulos como TNF- $\alpha$  o IFN- $\gamma$ , las subunidades  $\beta$  del proteasoma se intercambian por las denominadas  $\beta_i$  ( $\beta$  inducibles), lo cual le otorga cambios en la actividad catalítica (Groettrup *et al.*, 1996; Basler *et al.*, 2013). Su participación en la generación del extremo N-terminal es menos importante y son otras enzimas las que participan en su configuración final.

Entre estas se encuentran la oligopeptidasa Thimet (TOP), Nardylisina y la tripeptidil peptidasa II (TPP-II). Estas enzimas son peptidasas citosólicas capaces de degradar los péptidos generados por el proteasoma (York *et al.*, 2003; Kloetzel y Ossendorp, 2004; Firat *et al.*, 2007; Kessler *et al.*, 2011). A pesar de su presencia, la importancia de su contribución en la modulación del repertorio peptídico no está bien definida. Se ha descrito que algunas de ellas son importantes para la generación de epítomos concretos (Kessler *et al.*, 2011); sin embargo, no existe ningún estudio que indique que son capaces de modular el conjunto global de péptidos.

Para que las moléculas de MHC-I sean correctamente plegadas y cargadas con péptidos, estos últimos deben alcanzar el lumen del retículo endoplásmico (RE). El proceso es mediado por el transportador asociado a procesamiento antigénico (TAP). Este es un heterodímero de la familia de *ATP binding cassette* y transporta péptidos que poseen una longitud entre 8-16 aa desde el citosol hasta el RE (Koopmann *et al.*, 1996). TAP no solo presenta ciertas restricciones en el tamaño de los péptidos que transporta, sino también por algunos residuos que contienen, principalmente en las 3 posiciones N-terminales y a la C-terminal. Secuencias peptídicas con residuos hidrofóbicos en P3 e hidrofóbicos o cargados en P1 son favorecidas en el transporte, en cambio la presencia de prolina en P2 o P1, no lo son (Van Endert *et al.*, 1994; Van Endert *et al.*, 1995; Lauvau *et al.*, 1999).

En el RE los péptidos son hidrolizados a la longitud óptima para su unión a las moléculas de MHC-I por dos aminopeptidasas, denominadas ERAP1 y ERAP2. Ambas enzimas presentan algunas diferencias de especificidad y parecen actuar de manera concertada en el procesamiento de péptidos (Falk y Rötzschke, 2002; Serwold *et al.*, 2002; Kanaseki *et al.*, 2006; Kanaseki y Shastri, 2008; Blanchard *et al.*, 2010; Georgiadou *et al.*, 2010; Birtley *et al.*, 2011; Evnouchidou *et al.*, 2012).

Una vez que los péptidos adquieren el tamaño óptimo para su unión al MHC-I, se incorporan al complejo de carga peptídica (PLC). Este complejo está formado por las chaperonas Calnexina, Calreticulina, TAP, la oxidoreductasa ERp57 y la chaperona Tapasina. ERp57 y Tapasina forman una subunidad funcional covalente del PLC (Wearsch y Cresswell, 2008). El proceso de carga comienza con la unión de la HC y la Calnexina. Posteriormente se produce un intercambio de Calnexina por Calreticulina y la incorporación de  $\beta_2m$ . ERp57 forma los puentes disulfuros intra-catenarios durante el proceso de plegamiento (Sadasivan *et al.*, 1996; Hughes y Cresswell, 1998; Pamer y Cresswell, 1998; Wearsch *et al.*, 2004; Fu *et al.*, 2009; Chevet *et al.*, 2010). El péptido se une en el sitio de unión formado por los dominios  $\alpha_1$  y  $\alpha_2$  de la HC, en un proceso mediado por Tapasina. Esta proteína es la encargada de facilitar la unión de los péptidos al MHC-I, seleccionando los más afines. Sin embargo, su participación en este proceso parece ser dependiente del alotipo estudiado (Sadasivan *et al.*, 1996; Lehner *et al.*, 1998; Purcell *et al.*, 2001; Williams *et al.*, 2002; Howarth *et al.*, 2004; Dong *et al.*, 2009; Praveen *et al.*, 2010; Garstka *et al.*, 2011; Roder *et al.*, 2011; Geironson *et al.*, 2012; Geironson *et al.*, 2013). Una vez que el heterotrímero HC/ $\beta_2m$ /péptido se ha plegado correctamente, sigue el proceso de maduración normal de una proteína, produciéndose su salida desde el RE al Golgi y finalmente a la superficie celular a través de la vía exocítica (**Figura I2**).



**Figura I2: Procesamiento y presentación de antígenos por moléculas de MHC-I.** Los péptidos se generan mayoritariamente en el citosol debido a la acción del proteasoma, aunque pueden participar otras peptidasas citosólicas. Posteriormente son transportados al lumen del RE por TAP. En el RE pueden sufrir procesamiento N-terminal mediado por ERAP1 y ERAP2. Luego, el complejo de carga compuesto por TAP, Calreticulina, ERp57 y Tapasina facilitan la unión de péptidos de alta afinidad al complejo HC/β<sub>2</sub>m. Finalmente, el heterotrímero péptido/HC/β<sub>2</sub>m se disocia del PLC y se transporta a la superficie celular.

### 1.3 Procesamiento antigénico y enfermedades asociadas a MHC-I.

Existen diversas enfermedades que se encuentran fuertemente asociadas a la presencia de algunos de estos alotipos de MHC-I. Esto, sugiere que su papel patogénico podría residir en su función de presentación de péptidos.

Dos mecanismos serían posibles: 1) la presentación de péptidos específicos, cuya acción directa influya en el reconocimiento por parte del sistema inmune y 2) alteraciones globales del peptidoma, lo cual no solo afectaría a péptidos concretos, sino también a las propiedades biológicas y potencial pro-inflamatorio de las moléculas de MHC-I.

En la **Tabla I1** se muestra un conjunto de enfermedades ligadas a alelos de MHC-I, sus distintas características de asociación y la posible participación de otros factores capaces de modular el procesamiento de antígenos, como ERAP1 y ERAP2.

#### 1.3.1 Antígenos específicos y Artritis Reactiva (ReA).

La ReA forma parte de un grupo de enfermedades reumatológicas denominadas espondiloartropatías, las cuales presentan manifestaciones axiales y periféricas, y cuyo prototipo es la espondilitis anquilosante (AS). La ReA presenta una asociación variable con el antígeno HLA-B\*27, estimándose entre 30-50% (Brewerton *et al.*, 1973). Este

porcentaje es particularmente alto en los casos de evolución hacia formas crónicas de esta enfermedad (Khan, 2002; Carter y Hudson, 2010).

Enfermedad	Alelo	Frecuencia (%)	OR <sup>a</sup>	Enzimas	Epistasis
BSCR	A*29:02	90-100	50-250	ERAP2	-
AS	B*27	>90	80-100	ERAP1/ERAP2	SI/NO
ReA	B*27	30-50	20-50	-	-
Behçet	B*51:01	50-80	3.5-10.5	ERAP1	SI
Psoriasis	C*06:02	~30	1.3-4.7	ERAP1	SI

**Tabla I1: Enfermedades asociadas a MHC-I.** Se incluye además la participación de enzimas relacionadas al procesamiento antigénico involucradas en algunas de estas patologías. BSCR: Retinopatía en perdigonada. AS: Espondilitis anquilosante. ReA: Artritis reactiva. <sup>a</sup>OR: *odds ratio*. Estos valores varían en la literatura y son aproximados.

La ReA es producida por un conjunto de bacterias gram negativas denominadas bacterias artrítogénicas, las cuales pueden ser intracelulares obligadas o facultativas. Los principales géneros de este grupo son: *Chlamydia*, *Salmonella*, *Shigella*, *Campylobacter* y *Yersinia*, e infectan los epitelios gastrointestinal y genitourinario (Colmegna *et al.*, 2004).

*C. trachomatis*, es un parásito intracelular obligado considerado uno de los principales agentes infecciosos en enfermedades de transmisión sexual, y a su vez de los principales agentes etiológicos en la ReA. Sin embargo, su presencia es a menudo asintomática y de difícil diagnóstico (Carter y Hudson, 2010).

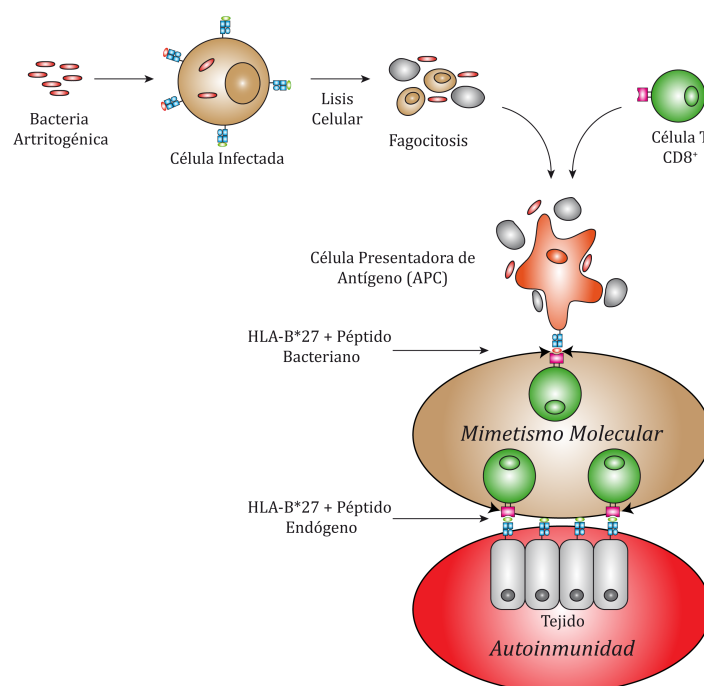
La asociación de HLA-B\*27 con la ReA ha sugerido la hipótesis de que la presentación de un péptido bacteriano por HLA-B\*27, con homología a un ligando natural propio de esta molécula, podría dar lugar a una respuesta autoinmune mediada por HLA-B\*27, basada en el mimetismo molecular y antigénico de ambos epítomos. Esta hipótesis, denominada del péptido artrítogénico, se resume en la **Figura I3** (Benjamin y Parham, 1990).

Estudios *in vitro*, utilizando péptidos sintéticos, demostraron que diversos epítomos derivados de *C. trachomatis* son reconocidos por células T CD8<sup>+</sup> de pacientes con ReA (Kuon *et al.*, 2001; Kuon y Sieper, 2003a). Sin embargo, solo en un caso se demostró directamente su procesamiento endógeno y presentación por HLA-B\*27 en células vivas. Este epítomo, ARKLLLDNL, deriva de la proteína PqqC (*pyrroloquinoline-quinone synthase-like protein*) y muestra homología de secuencia con proteínas humanas (Cragnolini *et al.*, 2009). No obstante, no se demostró una posible reacción cruzada, mediada por CTLs, con péptidos de origen humano.

Estudios llevados a cabo en ratas transgénicas, sugieren que HLA-B\*27 estaría participando en esta patología, mediante un mecanismo de mimetismo molecular acorde con la hipótesis del péptido artrítogénico. Así, esplenocitos de ratas inmunizadas con la



molécula de HLA-B\*27 y estimuladas *in vitro* con células provenientes de ratas HLA-B\*27<sup>+</sup> tratadas con *C. trachomatis* generaron células T CD8<sup>+</sup> específicas contra *C. trachomatis* (Popov *et al.*, 2001). Además, esplenocitos de ratas HLA-B\*27<sup>+</sup> inmunizadas contra HLA-B\*27 desarrollaron auto-reactividad específica contra HLA-B\*27, tras ser estimuladas *in vitro* con *C. trachomatis* (Popov *et al.*, 2002). Estos estudios sugieren un posible mimetismo molecular entre péptidos derivados de la propia molécula de HLA-B\*27 con péptidos derivados de *C. trachomatis*.



**Figura I3: Hipótesis del péptido artritogénico.** Esta hipótesis propone que una bacteria artritogénica sería capaz de infectar una célula humana produciendo apoptosis y/o lisis celular. Las células presentadoras de antígeno (APC) profesionales, serían capaces de fagocitar estos cuerpos apoptóticos y el debris celular, y de esta manera procesar y presentar péptidos bacterianos unidos a HLA-B\*27. El reconocimiento cruzado producido por los CTLs, y mediado por la homología del péptido bacteriano y un péptido propio, sería el desencadenante en el inicio de la respuesta autoinmune contra células propias.

En estudios previos de nuestro laboratorio, se identificó un péptido derivado de la región intracitoplasmática de la propia molécula de HLA-B\*27, que es presentado endógenamente por esta misma molécula, y es altamente homólogo a una secuencia de la DNA primasa (DNAP) de *C. trachomatis* (Ramos *et al.*, 2002). Estudios posteriores confirmaron el procesamiento y la presentación endógena de un péptido derivado de esta región de la DNAP bacteriana en células HLA-B\*27<sup>+</sup> (Cragnolini y López de Castro, 2008).

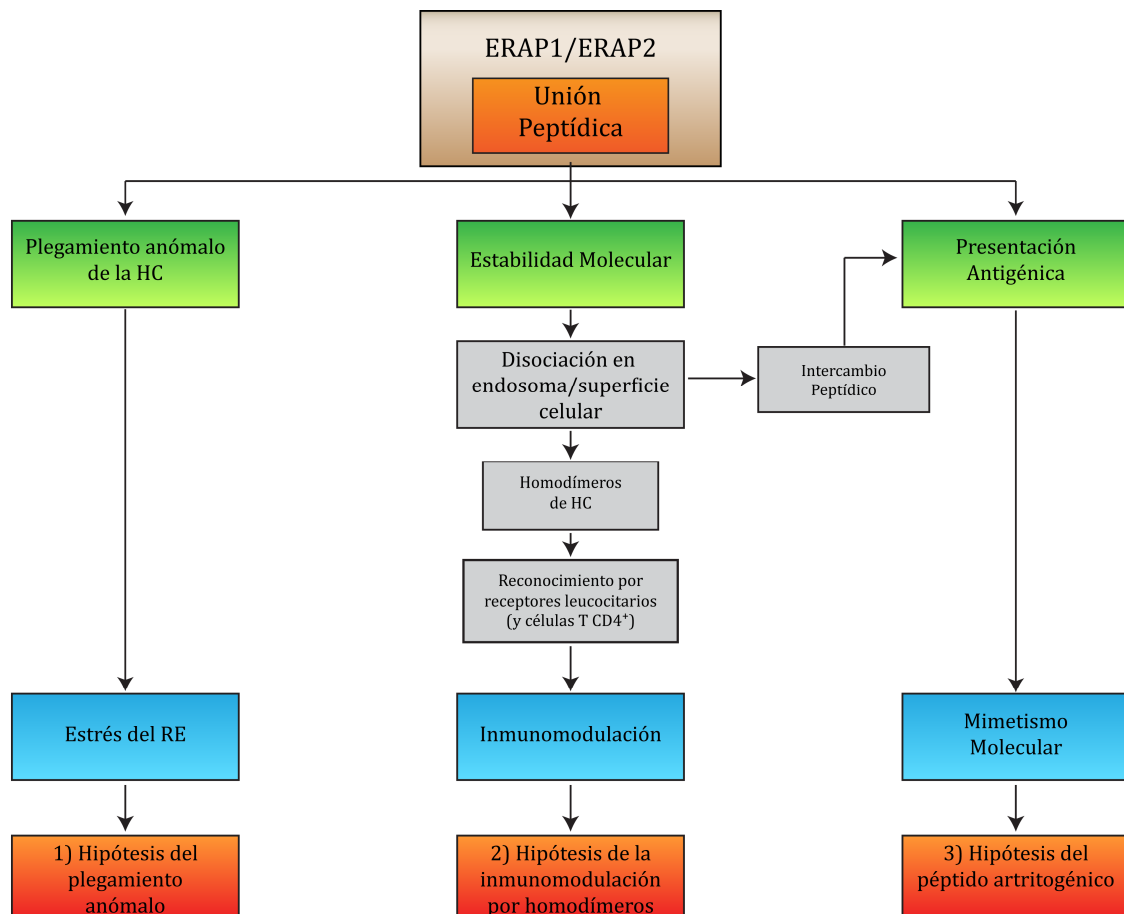
Uno de los objetivos abordados en esta tesis doctoral es la identificación de nuevos ligandos derivados de *C. trachomatis*, especialmente de aquellos con homología a

proteínas humanas y evaluar, a nivel bioquímico, la verosimilitud del mimetismo molecular como mecanismo patogénico en la ReA.

### ***1.3.2 Modulación global del peptidoma y el papel patogénico de HLA-B\*27 en la espondilitis anquilosante (AS).***

La alta asociación de HLA-B\*27 con AS no se explica fácilmente por la hipótesis del péptido artrítogénico, debido que no está demostrado que las bacterias sean un factor patogénico en AS. Además, un estudio en ratas transgénicas HLA-B\*27<sup>+</sup> que presentan una patología con gran similitud a la AS humana (Hammer *et al.*, 1990), demostró que el desarrollo de la enfermedad es dependiente de células T CD4<sup>+</sup>, descartando la participación de las T CD8<sup>+</sup>, al menos en este modelo (May *et al.*, 2003).

Existen ciertas propiedades moleculares de HLA-B\*27 que podrían conferir a esta molécula una capacidad pro-inflamatoria independiente de la presentación de un péptido específico. Estas propiedades, junto con su función en la presentación antigénica, llevaron a proponer dos hipótesis alternativas que tratan de explicar el papel patogénico de la molécula: 1) la hipótesis del plegamiento anómalo de la HC, propone que el mal plegamiento de la HC induciría una respuesta de estrés en el RE y una activación de la respuesta inflamatoria (Mear *et al.*, 1999; Colbert, 2000; Dangoria *et al.*, 2002; Antoniou *et al.*, 2004; DeLay *et al.*, 2009), 2) la hipótesis de la presentación de homodímeros en superficie propone que formas aberrantes de MHC-I, consistentes en dímeros de HC carentes de  $\beta_2m$ , se expresarían en la superficie celular e inducirían el reconocimiento por parte de las células NK y Th<sub>17</sub> (Células T helper 17), generando de esta manera una respuesta inflamatoria (Allen *et al.*, 2001; Kollnberger *et al.*, 2002; Bird *et al.*, 2003; Allen y Trowsdale, 2004; Kollnberger *et al.*, 2004; Bowness *et al.*, 2011). Es importante señalar que, puesto que el plegamiento y estabilidad de las moléculas de MHC-I dependen críticamente de la unión de péptidos, el peptidoma endógeno y sus alteraciones no solo modularían la presentación antigénica, sino todo el comportamiento molecular, incluidos el plegamiento y formación de homodímeros de superficie (**Figura I4**). Por lo tanto, el peptidoma de MHC-I es presumiblemente la piedra angular del papel patogénico de HLA-B\*27 y de otras moléculas de MHC-I asociadas a enfermedad.



**Figura I4: Papel del repertorio peptídico en la biología y patología de HLA-B\*27.** El repertorio peptídico tiene un papel central en la determinación de las distintas propiedades moleculares de HLA-B\*27. La unión de péptidos subóptimos podría inducir el plegamiento anómalo de la HC, disociación en superficie y formación de homodímeros e intercambio peptídico. Además, la especificidad de unión de HLA-B\*27, podría favorecer el reconocimiento autoinmune a través del mecanismo de mimetismo molecular, descrito anteriormente (Modificado a partir de Marcilla y López de Castro, 2008).

#### ***1.4 Aminopeptidasas del RE implicadas en el procesamiento de ligandos de MHC-I.***

Como se ha mencionado, existen dos aminopeptidasas residentes en el RE encargadas de procesar el extremo N-terminal de los péptidos generados por el proteasoma. Estas enzimas, ERAP1 y ERAP2 (ERAP: aminopeptidasa del RE), pertenecen a la familia M1 de las  $Zn^{+}$ -aminopeptidasas. Tienen una identidad de secuencia de aproximadamente 50%, contienen el dominio de unión de  $Zn^{+}$  HEXXH<sub>18</sub>E y GAMEN, los cuales son esenciales para la actividad enzimática (Hooper, 1994) y ambas son estimuladas en presencia de IFN- $\gamma$  (Saric *et al.*, 2002; Tanioka *et al.*, 2003). Las características particulares de cada enzima se detallan a continuación.

#### **1.4.1 ERAP1.**

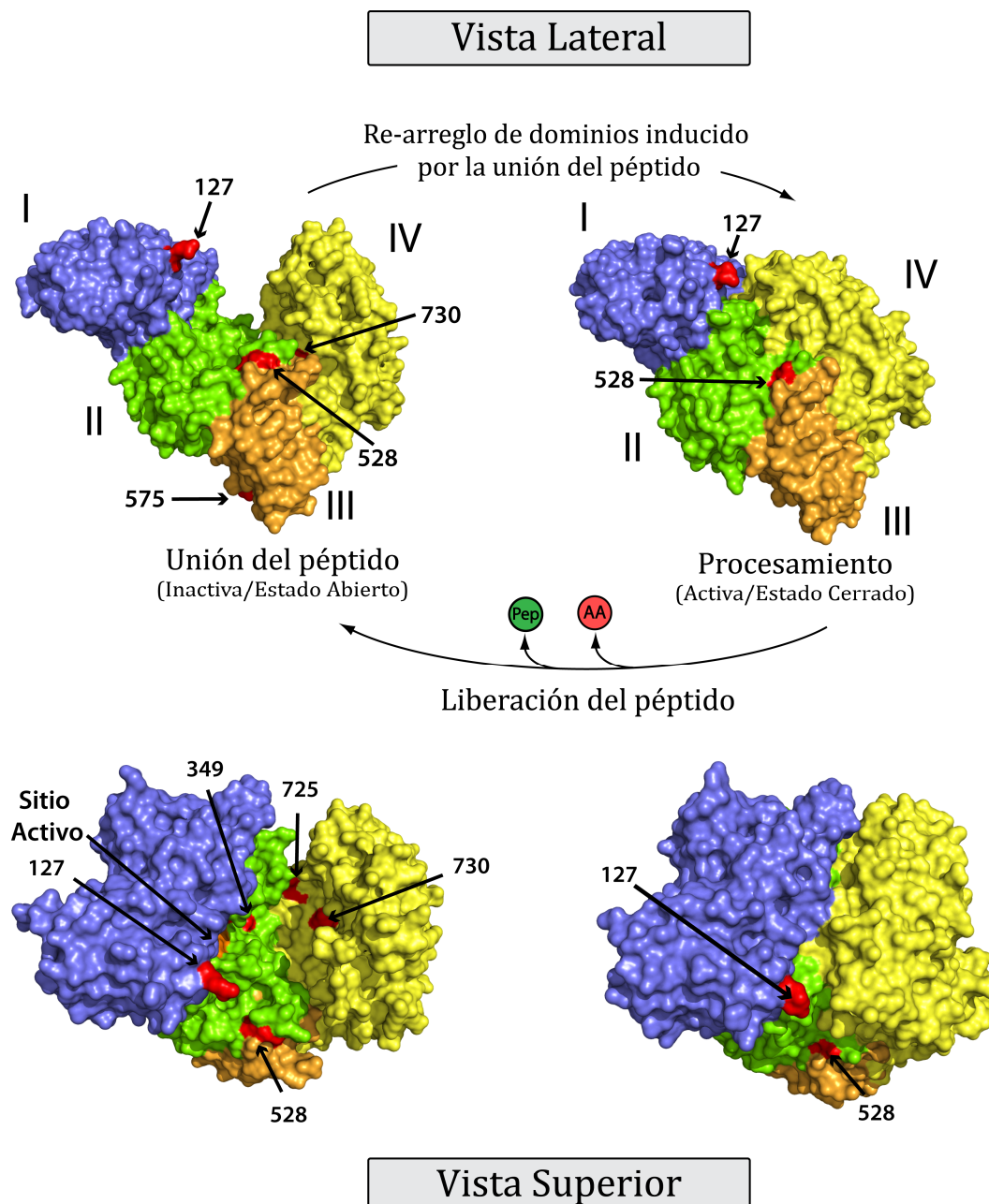
ERAP1 fue la primera aminopeptidasa descrita en el RE capaz de producir el último recorte de los péptidos hasta su longitud óptima para su unión a las moléculas de MHC-I (Saric *et al.*, 2002; York *et al.*, 2002). Su función principal es hidrolizar el extremo N-terminal de los péptidos hasta alcanzar una longitud de 8-9 aa y muestra una cinética de inhibición por sustrato (Evnouchidou *et al.*, 2011). Para llegar a esta longitud tan concreta, la enzima muestra un mecanismo de “regla molecular” que consiste en que el péptido se une a un sitio regulador, o de anclaje, distinto al sitio activo, los cuales se ubican a una distancia correspondiente a esta longitud de residuos. Esto explicaría por qué ERAP1 degrada con mayor eficiencia péptidos más largos (9-16 residuos) y más deficientemente péptidos menores (< 8 residuos), ya que estos no alcanzarían el tamaño mínimo entre ambos sitios (Chang *et al.*, 2005).

ERAP1 ha sido cristalizada en dos conformaciones, una abierta (inactiva) y otra cerrada (activa) (Kochan *et al.*, 2011; Nguyen *et al.*, 2011). Consta de 4 dominios comprendidos por los siguientes residuos: 1-254, 255-527/529, 528/530-613/614 y 614/615-941. La comparación de ambas estructuras muestra que el dominio III actuaría como bisagra entre el I-II y el IV. Durante la hidrólisis el dominio IV se movería sobre el III, cerrando la cavidad para llevar a cabo el proceso de corte. El péptido se uniría a la enzima a través de su extremo C-terminal en una cavidad conformada entre el dominio III-IV (sitio de unión o regulador), el extremo N-terminal alcanzaría el sitio catalítico y el residuo sería hidrolizado. El análisis de la estructura y la distancia encontrada entre el sitio de unión y el catalítico, concuerda con el mecanismo de “regla molecular” (Chang *et al.*, 2005; Kochan *et al.*, 2011; Nguyen *et al.*, 2011) (**Figura I5**)

La preferencia de ERAP1 por distintos residuos N-terminales se determinó utilizando sustratos fluorogénicos, péptidos sintéticos y minigenes expresados en el RE (Evnouchidou *et al.*, 2008; Evnouchidou *et al.*, 2009; Hearn *et al.*, 2009; Zervoudi *et al.*, 2011). En general, R, K, D, E son cortados deficientemente. Al contrario, C, A, L, M, Y se encuentran entre los mejores sustratos de esta enzima. La especificidad se ve afectada por el polimorfismo natural de la enzima (Reeves *et al.*, 2013).

#### **1.4.2 ERAP2**

ERAP2 presenta cierta homología en función y estructura con ERAP1, pero también posee particularidades que la diferencian notablemente. ERAP2 es capaz de degradar péptidos de diversas longitudes, incluyendo pequeños (< 8 residuos), debido a que no sigue el mecanismo de “regla molecular” (Chang *et al.*, 2005).



**Figura I5: Estructura de ERAP1, posible mecanismo y topología de los polimorfismos asociados a enfermedad.** La sección superior muestra una vista lateral de ERAP1. Los dominios de la proteína están indicados (I-IV). La conformación abierta es inactiva y disponible para la unión del sustrato. Esta unión induce un cambio conformacional hacia el estado cerrado, necesario para la hidrólisis del enlace peptídico en el extremo N-terminal. Tras el procesamiento, la enzima vuelve al estado abierto, permitiendo la liberación del péptido procesado. Los polimorfismos asociados a AS se encuentran en las siguientes posiciones: el residuo 127 se encuentra en el dominio I y cercano al dominio IV en la conformación cerrada. El residuo 528 se encuentra entre el dominio II y III, en la región que actúa como bisagra entre la conformación abierta y cerrada. El residuo 575 se localiza en un *loop* del dominio III, lejano a cualquier región interdominio. La sección inferior muestra una vista superior de la enzima en ambos estados conformacionales. Los polimorfismos restantes se encuentran en las siguientes posiciones: el residuo 349 se encuentra cercano al sitio catalítico y los residuos 725 y 730 están en la cavidad de unión al sustrato (Modificado a partir de Alvarez-Navarro y López de Castro, 2014).

Ambas enzimas, presentan una topología similar, pero difieren hacia el extremo C-terminal. Este extremo de la proteína conforma el sitio de unión del péptido, de tal forma que en ERAP2 no hay una distancia mínima necesaria para que se produzca la catálisis del extremo N-terminal del péptido, sino que este podría alcanzar el sitio activo directamente (Birtley *et al.*, 2011).

ERAP2 muestra cierta preferencia por residuos básicos (Saveanu *et al.*, 2005; Zervoudi *et al.*, 2011; Evnouchidou *et al.*, 2012) y cierta dificultad en el procesamiento de péptidos que pueden ser buenos sustratos de ERAP1. La actividad enzimática está modulada por el polimorfismo de ERAP2 en la posición 392 (Evnouchidou *et al.*, 2012).

Ambas enzimas podrían actuar de manera concertada, interaccionando y modulando mutuamente su actividad, además de complementar sus actividades catalíticas mediante la acción diferencial sobre los sustratos. Hay que destacar que ninguna de las dos enzimas es capaz de hidrolizar un enlace que contenga P en el extremo N-terminal, ya sea P-X o X-P. (Saveanu *et al.*, 2005; Lorente *et al.*, 2013; Evnouchidou *et al.*, 2014).

### **1.5 Asociación de ERAP1 y ERAP2 en enfermedades ligadas a MHC-I.**

Estas enzimas se encuentran asociadas a distintas enfermedades de MHC-I, probablemente debido al papel que juegan en el procesamiento de ligandos. Además, sus distintos polimorfismos se pueden encontrar asociados de manera diferencial a distintas enfermedades. Por lo cual no existe un patrón único de acción de estas enzimas (**Tabla I2**).

#### **1.5.1 ERAP1**

El polimorfismo de ERAP1 tiene consecuencias funcionales. La posición mejor caracterizada es la 528, la cual modula drásticamente la actividad enzimática y la generación de ligandos *in vitro* (Goto *et al.*, 2006; Evans *et al.*, 2011; Evnouchidou *et al.*, 2011). Otros estudios han determinado también un efecto de la posición 575 (Martín-Esteban *et al.*, 2014) y 730 (Evnouchidou *et al.*, 2011).

La actividad catalítica también es dependiente del conjunto de polimorfismos presentes y no solo de la acción de residuos individuales (Reeves *et al.*, 2013; Martín-Esteban *et al.*, 2014; Reeves *et al.*, 2014).

SNP	Cambio <sup>b</sup>		Riesgo incrementado en enfermedad (AA)		
	Base	AA	AS (HLA-B*27)	Psoriasis (HLA-C*06:02)	Behçet (HLA-B*51:01)
rs26653	C380G	P127R	R	R	nd
rs2287987	A1045G	M349V	M	nd	nd
rs30187	G1583A	R528K	K	K	nd
rs10050860	G1723A	D575N	D	nd	N
rs17482078	G2174A	R725Q	R	nd	Q
rs27044	G2188C	E730Q	Q	nd	nd

**Tabla I2: Polimorfismos no sinónimos de ERAP1 asociados a enfermedades ligadas a MHC-I.** La asociación de rs10050860 y rs17482078 no se distinguen en los análisis genéticos debido al desequilibrio de ligamiento existente entre ambas posiciones. <sup>b</sup>Alelo mayor al menor. nd: No determinado. AA: Aminoácido

ERAP1 está asociado con AS en epistasis con HLA-B\*27 (Evans *et al.*, 2011), lo cual significa que la variante de ERAP1 asociada con AS, es de riesgo solo si está presente HLA-B\*27. La asociación entre ERAP1 y AS ha sido confirmada en diversos estudios y poblaciones (Burton *et al.*, 2007; Harvey *et al.*, 2009; Choi *et al.*, 2010; Reveille *et al.*, 2010; Lin *et al.*, 2012; Pimentel-Santos *et al.*, 2013). ERAP1 también se encuentra en epistasis con otros alelos asociados a enfermedades de MHC-I: con HLA-C\*06:02 en psoriasis (Strange *et al.*, 2010; Sun *et al.*, 2010; Julià *et al.*, 2012; Yang *et al.*, 2012) y con HLA-B\*51 en enfermedad de Behçet (Kirino *et al.*, 2013; Conde-Jaldón *et al.*, 2014; Ombrello *et al.*, 2014).

Estudios realizados sobre el peptidoma de HLA-B\*27:04 demostraron que ERAP1 es fundamental para configurar su repertorio peptídico. Se generaron péptidos más cortos en una enzima con mayor actividad (528K) y la presencia de péptidos más largos con una variante menos activa (528R) fue acompañada por una disminución de la termoestabilidad (García-Medel *et al.*, 2012). Además, la ausencia de enzima llevó a una alteración en la expresión en la superficie celular de subtipos de HLA-B\*27 asociados con AS (Haroon *et al.*, 2012) y una alteración de los patrones de longitud y reconocimiento de epítomos específicos en HLA-B\*27:05 (Chen *et al.*, 2014). Estos resultados sugieren que ERAP1 no solo participa configurando el repertorio peptídico, sino que también modula distintas propiedades biológicas de las moléculas de MHC-I.

### **1.5.2 ERAP2**

El polimorfismo K392N es el único presente en ERAP2 capaz de modular su actividad catalítica (Evnouchidou *et al.*, 2012). Existen otros dos polimorfismos que afectan la expresión de esta enzima. Uno de ellos, rs2248374, se encuentra en el sitio de *splicing* del exón 10 y produce un codón *stop* prematuro y la degradación del mensajero por NMD (*nonsense-mediated decay*) (Andrés *et al.*, 2010). El polimorfismo rs7705093 se encuentra dentro del gen de LNPEP (*leucyl/cystinyl aminopeptidase*) y presenta un LD muy fuerte con otros SNPs (*Single Nucleotide Polymorphism*) dentro de la región que contiene ERAP1, ERAP2 y LNPEP. Particularmente, este SNP está en LD casi perfecto con rs10044354, polimorfismo que lleva a la baja/nula expresión de ERAP2 (Kuiper *et al.*, 2014). Los mecanismos por el cual estos dos SNPs determinan los niveles de expresión de la enzima, aún no han sido caracterizados.

La asociación de ERAP2 a enfermedad parece tener como factor común su expresión. En la retinopatía en perdigonada (BSCR), la enfermedad se asocia a la presencia de la enzima debido al SNP rs7705093 (Kuiper *et al.*, 2014). En AS, se encuentran asociados el polimorfismo rs2549782 (392N), que codifica para una variante de mayor actividad enzimática y el rs2248374, que se encuentra en LD con rs2549782, y afecta la expresión de la enzima. Por tanto, la ausencia de la variante enzimática más activa es protectora y la presencia de enzima, aunque es la variante de menor actividad, incrementa el riesgo de enfermedad (Cortes *et al.*, 2013).

### **1.6 BSCR, ERAP2 y la posible implicación de ERAP1.**

BSCR presenta la asociación más fuerte entre un alotipo de MHC-I y una enfermedad, incluso más alta que la encontrada en AS. Clínicamente se caracteriza por ser una uveítis posterior y muy restringida en su localización, produciendo una atrofia generalizada de la retina y el corioide y por un aumento en la inflamación intraocular, la cual finalmente deriva en una pérdida de visión. A pesar de que se conoce desde hace tiempo su asociación con HLA-A\*29, existía controversia respecto al subtipo relevante en esta enfermedad. En un estudio genético reciente, se ha determinado que la asociación es con HLA-A\*29:02 y no con A\*29:01 (Kuiper *et al.*, 2014). La frecuencia de HLA-A\*29 es cercana al 7% en individuos sanos, pero >95% en los pacientes con BSCR (Shah *et al.*, 2005; Brézín *et al.*, 2011).

Este estudio genético también describió una asociación con ERAP2, determinada por un SNP localizado entre los loci que codifican para ERAP1, ERAP2 y LNPEP. Su caracterización posterior indicó que esta asociación se relacionaba con la presencia de la



enzima, y no con una alteración en sus propiedades catalíticas. Este hallazgo sugirió que ERAP2 podría estar implicado en la generación de un autoantígeno específico presentado por A\*29:02 e influir de esta manera en la susceptibilidad a la enfermedad (Kuiper *et al.*, 2014; Kuiper *et al.*, 2015).

Existen ciertas consideraciones que permiten, sin descartarla, cuestionar esta hipótesis en el estado actual de nuestros conocimientos. En primer lugar, los estudios genéticos no excluyeron una participación de ciertos polimorfismos de ERAP1 que afectan a la actividad catalítica pero no a la expresión de la enzima. En segundo lugar, mientras que la función de ERAP2 en el procesamiento de ligandos está poco definida, el polimorfismo de ERAP1 altera sustancialmente el peptidoma de HLA-B\*27, adquiriendo un papel relevante. Por lo tanto, es posible que ERAP1 influya en la susceptibilidad de la BSCR alterando el peptidoma de A\*29:02, y que la participación de ERAP2 en esta enfermedad dependa del contexto y acción de ERAP1, puesto que ambas enzimas actúan concertadamente en el procesamiento antigénico (Saveanu *et al.*, 2005; Evnouchidou *et al.*, 2014). Por esta razón, uno de los objetivos de esta tesis es caracterizar el peptidoma de A\*29:02 y los posibles efectos de ERAP1 en su configuración.







## **OBJETIVOS**



**Objetivo General:** Definir las bases moleculares que apoyan un papel del procesamiento peptídico en la patogenia de las enfermedades asociadas a MHC-I, centrándonos en dos aspectos: 1) el papel del mimetismo molecular entre antígenos bacterianos y propios en la ReA asociada a HLA-B\*27 y 2) la caracterización de las alteraciones inducidas en el peptidoma de HLA-A\*29:02, asociado con BSCR, por el polimorfismo de ERAP1 relevante en otras enfermedades inflamatorias ligadas a MHC-I.

Los objetivos específicos fueron los siguientes:

**Objetivo 1:** Estudiar el procesamiento y presentación endógenos de péptidos de *Chlamydia trachomatis*, incluyendo aquellos con alta homología a ligandos naturales propios de HLA-B\*27.

**Objetivo 2:** Caracterizar el peptidoma constitutivo de HLA-A\*29:02.

**Objetivo 3:** Analizar las alteraciones inducidas por el polimorfismo y la expresión de ERAP1 en el peptidoma de HLA-A\*29:02.





## **MATERIALES Y MÉTODOS**



### **M.1 Construcciones génicas.**

Con el fin de garantizar la correcta expresión de las proteínas bacterianas y evitar cualquier problema que pueda presentar la transcripción y traducción de estos genes en un sistema eucariótico, se diseñaron distintas construcciones como proteínas de fusión al extremo C-terminal de EGFP. Se amplificó el gen de ClpC (*CLP protease ATP-binding subunit C*) a partir del cDNA de *C. trachomatis* serovar L2 (Advances Biotechnologies, Columbia, MD) utilizando oligonucleótidos específicos y se clonó en el vector pEGFP-C1 (BD Biosciences Clontech) usando los sitios de restricción *BglII* y *Sall*. Se realizaron distintas construcciones basadas en cortes específicos producidos por distintas enzimas de restricción, lo cual permitió obtener una proteína bacteriana truncada en el extremo C-terminal, y que mantuvo la presencia del epítipo antigénico ClpC(7-15) (UniProtKB/Swiss-Prot O84288). Finalmente, se generaron dos proteínas de fusión: ClpC(1-512) y ClpC(1-570), las cuales contienen 512 y 570 aa, respectivamente.

### **M.2 Generación de transfectantes y cultivos celulares.**

La línea linfóide Hmy.2-C1R (C1R) posee una baja expresión de los alelos constitutivos HLA-B\*35:02 y HLA-C\*04:02 (Storkus *et al.*, 1987; Zemmour *et al.*, 1992). Esta línea, transfectada previamente con HLA-B\*27:05 (Calvo *et al.*, 1990), se utilizó para generar transfectantes estables de la proteína ClpC de *C. trachomatis*. Las construcciones se co-transfectaron junto con el vector RSV.5 (Long *et al.*, 1991) modificado con el gen de resistencia a higromicina (cedido por la Dra. Dolores Jaraquemada, UAB) en una relación 20:1 mediante electroporación a 300 mV y 960 µF en un electroporador Gene Pulser™ (BioRad, Hercules, CA). Los transfectantes se seleccionaron en medio RPMI suplementado con higromicina 250 µg/ml, 10% de suero bovino fetal (FBS) (ambos de Invitrogen), 2 mM glutamina, 25 mM HEPES, estreptomycin y penicilina.

Las líneas celulares linfoides C1R (baja expresión de HLA-B\*35, C\*04), C1R-B\*27:05 (HLA-B\*27:05, baja expresión de HLA-B\*35, C\*04), MOU (HLA-A\*29:02, B\*44:03, C\*16:01), SWEIG (HLA-A\*29:02, B\*40:02, C\*02:02) y PF97387 (HLA-A\*29:02, B\*44:03, C\*16:01) se crecieron en medio RPMI suplementado con 10% de FBS, 2 mM glutamina, 25 mM HEPES, estreptomycin y penicilina.

### **M.3 Caracterización de SNPs de ERAP1 y ERAP2 mediante genotipaje.**

Se utilizaron aproximadamente  $5 \times 10^6$  células para la extracción del DNA genómico de cada una de las líneas celulares HLA-A\*29+. La secuenciación de ERAP1 se realizó utilizando oligonucleótidos específicos para cada exón, los cuales contienen secuencias complementarias de M13, u oligonucleótidos específicos carentes de las secuencias derivadas de M13. Estos oligonucleótidos fueron diseñados para identificar los siguientes SNPs que se encuentran en la secuencia codificante del gen de ERAP1: rs26653, rs26618, rs27895, rs27044, rs30187, rs10050860, rs17482078 y rs2287987. Los exones donde se encuentran los SNP fueron amplificados por PCR usando AmpliTaq Gold PCR Master Mix (Applied Biosystems), posteriormente purificados usando ExoSap (USB Corp., Cleveland, OH) y secuenciados en un analizador 3730XL (Applied Biosystems). Cuando hubo ambigüedad en alguna secuenciación, se procedió a la secuenciación de la hebra complementaria.

Para la secuenciación de los SNPs asociados a ERAP2, se utilizó el mismo procedimiento descrito anteriormente, con las siguientes modificaciones. La amplificación se realizó sobre el exón 7 para la secuenciación del SNP rs2549782, y se amplificaron zonas que incluyen los SNPs rs2248374 y rs10044354, que no pertenecen a la región codificante. La amplificación, purificación y secuenciación se realizó de la manera descrita anteriormente. Los polimorfismos secuenciados de ambas enzimas se encuentran en la **Tabla R4**.

### **M.4 Anticuerpos.**

Se utilizaron los siguientes anticuerpos:

A6455: antisuero de conejo anti-GFP (Invitrogen)

W6/32: anticuerpo monoclonal (IgG2a) contra un determinante monomórfico de HLA-A, B y -C (Barnstable *et al.*, 1978).

108-2C5: anticuerpo monoclonal (IgG1) contra un determinante antigénico que reconoce la molécula HLA-A plegada (Lozano *et al.*, 1989).

HCA2: anticuerpo monoclonal (IgG1) contra un determinante antigénico de HLA-A, que reconoce la molécula sin plegar (Stam *et al.*, 1990).

3F5: anticuerpo monoclonal anti-ERAP2 humano (R&D Systems, Minneapolis, USA).

6H9: anticuerpo monoclonal anti-ERAP1 humano (R&D Systems, Minneapolis, USA).

GTU88: anticuerpo monoclonal anti- $\gamma$ -tubulina (IgG1) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA).

### **M.5 Citometría de flujo.**

Las células transfectadas de manera estable con las proteínas de fusión se analizaron mediante citometría de flujo, por medición directa de la fluorescencia asociada a EGFP. Para ello, las células se lavaron dos veces con PBS y se centrifugaron a 500xg durante 5 min. La detección se llevó a cabo en un citómetro FACSCalibur (excitación 488 nm, emisión 507 nm), los datos fueron adquiridos utilizando el software CellQuest™ Pro v4.0.2 (BD Biosciences) y analizados usando FlowJo v7.5 (Tree Star, Inc, Ashland, USA).

Para la determinación de la expresión de HLA-A\*29:02 en la superficie celular se utilizaron  $3 \times 10^5$  células, se lavaron dos veces con 200  $\mu$ l de PBS y se centrifugaron a 500xg durante 5 min. Posteriormente se incubaron con los respectivos anticuerpos primarios, 108-2C5 o HCA2, a una concentración de 30 y 10  $\mu$ g/ml, respectivamente. La incubación se realizó durante 30 min a 4°C. Posteriormente, las células fueron lavadas tres veces con 200  $\mu$ l de PBS e incubadas con un anticuerpo secundario anti-ratón conjugado con FITC, a 0.5  $\mu$ g/ml, durante 30 min y 4°C. Finalmente, las células fueron lavadas, como se describió anteriormente y fijadas usando 1% de paraformaldehído en PBS. La adquisición y análisis de las muestras se realizó de la manera descrita en el párrafo anterior.

### **M.6 Inmunoprecipitación y Western blot.**

Para la determinación de la expresión de proteínas de *C. trachomatis*, se lisaron aproximadamente  $2 \times 10^6$  células en 0.5% Igepal CA-630 (Sigma), 5 mM  $MgCl_2$ , 50 mM Tris-HCl pH 7.4 en presencia de una mezcla de inhibidores de proteasas (Complete Mini, Roche) durante 30 min, en agitación constante y 4°C. Posteriormente se incubaron con un anticuerpo anti-IgG de conejo acoplado a bolas de sefarosa durante 3 h. El sobrenadante fue inmunoprecipitado utilizando bolas de sefarosa acopladas con un anticuerpo policlonal anti-GFP (A6455), en agitación continua durante 3 h y 4°C. Los inmunoprecipitados se lavaron 3 veces usando el mismo tampón de lisis y se desnaturalizaron durante 5 min en tampón de carga (0.0625 mM Tris-HCl pH 6.8, 5%  $\beta$ -mercaptoetanol, 10% glicerol, 4% SDS, Azul de bromofenol). Las muestras se procesaron mediante 10% SDS-PAGE y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa a 20 mA, durante toda la noche. La inmunodetección se realizó usando el anticuerpo A6455 (1:1000) y anti-IgG de conejo conjugado con peroxidasa (1:5000), diluidos en tampón de bloqueo (5% leche, 0.1% Tween 20 en PBS). Los inmunoblots fueron revelados utilizando el sistema de detección ECL (Amersham Biosciences).

El análisis de la expresión de ERAP1, ERAP2 y  $\gamma$ -tubulina en diferentes líneas celulares se realizó utilizando aproximadamente  $3 \times 10^5$  células, directamente sobre el lisado, sin inmunoprecipitación. Para la inmunodetección de ERAP1, ERAP2 y  $\gamma$ -tubulina

se utilizaron los anticuerpos: 6H9, 3F5, y GTU88, respectivamente, y un anticuerpo secundario policlonal anti-IgG de ratón preparado en cabra conjugado con peroxidasa (DakoCytomation, Glostrup, Denmark).

### ***M.7 Aislamiento de péptidos unidos a MHC-I.***

Para la purificación de péptidos provenientes de HLA-B\*27:05 y HLA-A\*29:02 se utilizaron  $1 \times 10^{10}$  y  $2 \times 10^9$  células, respectivamente. El proceso en ambos casos es esencialmente el mismo y solo difieren en los anticuerpos utilizados para inmunoprecipitar cada alelo de MHC-I. Las células se lisaron en 1% Igepal CA-630, 20 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.2%  $\text{NaN}_3$ , en presencia de una mezcla de inhibidores de proteasas (Complete, Roche) y PMSF 2 mM, durante 1 h a 4°C y agitación constante. El lisado se sometió a dos etapas de centrifugación diferencial, primero a 1000xg durante 10 min y 4°C y posteriormente a 100000xg, 1 h a 4°C. El sobrenadante se aplicó sobre una precolumna de sefarosa bloqueada con Tris-HCl. El eluido de la precolumna se sometió a cromatografía de inmunoafinidad utilizando los anticuerpos W6/32 y 108-2C5 para inmunoprecipitar HLA-B\*27:05 y HLA-A\*29:02, respectivamente. El heterotrímero se eluyó utilizando 0.1% ácido trifluoroacético (TFA) en agua, a temperatura ambiente. Se separaron los péptidos de la HC y  $\beta_2\text{m}$  por filtración usando Vivaspín 2 (Sartorius Stedim Biotech, Gottingen, Alemania) y se concentraron utilizando un SpeedVac (Savant Global Medical Instrumentation, Ramsey, MN). Previo a su análisis, las muestras fueron desaladas y concentradas utilizando puntas OMIX C18.

### ***M.8 Espectrometría de Masas (MS).***

#### ***M.8.1 Electrospray-LTQ-Orbitrap MS/MS.***

Las muestras fueron analizadas utilizando un HPLC capilar (Eksigent, Dublin, CA) acoplado a un espectrómetro de masas Orbitrap XL (Thermo Fisher Scientific). Los péptidos fueron eluidos a un flujo de 0.25  $\mu\text{l}/\text{min}$  en un gradiente lineal de 7-40% de acetonitrilo en 0.1% ácido fórmico durante 90 min, seguidos de 17 min a 95% acetonitrilo en 0.1% ácido fórmico. En algunos casos se utilizó el mismo gradiente durante 214 min, con una elución isocrática final de 29 min. Los espectros se adquirieron en el analizador Orbitrap en modo *Full Ion Scan (Full MS)* en un rango de  $m/z$  de 400-2000 y una resolución de 60000. Las siete masas más intensas de cada espectro *Full MS* en carga +1, +2 o +3 fueron seleccionadas para fragmentarlas mediante CID (*Collision-induced dissociation*) en la trampa lineal.

### M.8.2 Electrospray-LTQ-Velos MS/MS.

El peptidoma proveniente de líneas HLA-B\*27<sup>+</sup> se fraccionó mediante HPLC, utilizando una columna Vydac C18 (0.21×25 cm) con un tamaño de poro de 5 µm (Vydac, Hesperia, CA) y un gradiente isocrático de solvente A (TFA 0.08% en agua) durante 10 min, un incremento lineal de 0 a 44% de solvente B (acetonitrilo 80%, TFA 0.075% en agua) durante 90 min y un segundo incremento de 44 a 100% de solvente B durante 35 min. La cromatografía fue monitorizada mediante la medición de absorbancia, a 210 y 280 nm, se colectaron fracciones de 50 µl y se almacenaron a -20°C para su posterior análisis.

Se utilizaron péptidos sintéticos para determinar los tiempos de retención (*rt*) y de esta manera hacer una búsqueda dirigida de las especies de interés dentro de los peptidomas. La determinación de estos tiempos se realizó bajo el mismo procedimiento de HPLC descrito anteriormente. Una vez determinados los tiempos de retención, se utilizaron fracciones individuales (10 µl), o se reunieron fracciones del *pool* peptídico (10 µl de cada fracción, *rt* ± 3 min), se llevaron a 100 µl, se desalaron y concentraron utilizando puntas OMIX C18.

La búsqueda específica de péptidos concretos se realizó en modo dual, usando un modo de selección múltiple de iones, SMIM (*Selected multiple ion monitoring*) y el modo de exclusión dinámica. Cada fracción se secó, resuspendió en 9 µl de 0.1% ácido fórmico y se analizó en un sistema µHPLC Agilent 1100 acoplado a un espectrómetro de masas LTQ-Velos pro. Los péptidos se separaron por cromatografía de fase reversa usando una columna BioBasic C18 RP (0.18 x 150 mm) (Thermo Fisher Scientific) y se eluyeron mediante un gradiente de 5-40% de solvente B (Solvente A: 0.1% ácido fórmico en agua, Solvente B: 0.1% ácido fórmico en 80% acetonitrilo en agua) a un flujo constante de 1.8 µl/min, durante 80 min. Los péptidos se detectaron en modo SMIM en estados de carga +1, +2 y +3. En paralelo al modo SMIM, se realizó un barrido sobre el rango de *m/z* de 400-2000 (*scans* de 1 µs), seguido de fragmentación MS-dependiente (MS/MS), usando una ventana de aislamiento de 2 *m/z*, una energía de colisión normalizada de 35% y exclusión dinámica de 30 s.

La identificación de los péptidos derivados de *Chlamydia* se realizó mediante comparación del patrón de fragmentación con el obtenido del correspondiente péptido sintético. Para ello, este fue fragmentado utilizando un espectrómetro LTQ-Velos pro solo en modo SMIM, bajo las mismas condiciones descritas anteriormente, excepto que se utilizó un gradiente cromatográfico de 35 min.

### M.8.3 Q-Exactive plus MS/MS.

Los peptidomas provenientes de líneas HLA-A\*29<sup>+</sup> se analizaron mediante HPLC capilar Ultimate 3000 RSLCnano UHPLC (Thermo Fisher) acoplado a un espectrómetro Q-Exactive Plus (Thermo). Los péptidos se separaron mediante cromatografía de fase reversa utilizando una columna Reprosil C18-Aqua (Dr. Maisch, GmbH, Alemania), un gradiente de 7-40% acetonitrilo en 0.1% ácido fórmico durante 180 min, un flujo constante de 0.15 µl/min y un tiempo de exclusión dinámica de 20 s. Se realizó un barrido sobre el rango de m/z de 300-1800 AMU, a una resolución de 70000, del cual se seleccionaron los 10 iones con intensidad más alta y se fragmentaron mediante HCD (*High-energy Collision Dissociation*) a una energía de colisión normalizada de 25 eV. Los espectros MS/MS fueron adquiridos a partir de una relación m/z de 100 y una resolución de 17500.

### M.9 Búsqueda en bases de datos.

Para los péptidos derivados de *Chlamydia* se usó como motor de búsqueda el software Mascot server 2.2 (Matrix Science Inc., Boston, MA). Los parámetros de búsqueda fueron los siguientes: para el LTQ-Velos, 0.5 Da de tolerancia de masas para el ion precursor y los iones de fragmentación. Para el LTQ-Orbitrap XL, 0.01 y 0.5 Da de tolerancia de masas para el ion precursor y los iones de fragmentación, respectivamente. Las modificaciones variables seleccionadas fueron oxidación de metionina y desaminación de asparagina y glutamina. Para estos péptidos bacterianos se utilizó una base de datos pequeña que contuvo las siguientes proteínas: ClpC (B0B7K2), DNAP (B0B920) y NQRA (O84639) de *C. trachomatis*, HLA-B\*27 (P03989), HLA-B\*35 (P30685) y HLA-C\*04 (P30504), de *Homo sapiens* y EGFP (AAB02576.1). Además, se comprobaron estos espectros de fragmentación mediante una búsqueda restringida a *Homo sapiens* en la base de datos UniProt/Swiss-Prot (*release* 57.6, 07/2009, con 20331 entradas), utilizando los mismos parámetros descritos anteriormente. Las secuencias que presentaron los *scores* más altos se analizaron manualmente y se validaron comparando con el espectro MS/MS del péptido sintético respectivo.

La identificación de las secuencias provenientes de HLA-A\*29, y su posterior cuantificación, se realizó utilizando el software MaxQuant (versión 1.4.0.8) (Cox y Mann, 2008) con el motor de búsqueda Andromeda (Cox *et al.*, 2011) y la sección de *Homo sapiens* proveniente de la base de datos UniProt/Swiss-Prot (*release* 2013\_05 con 20257 entradas). Los parámetros de búsqueda fueron los siguientes: tolerancia de masa del ion precursor y tolerancia de masas de los iones de fragmentación 20 ppm, FDR (*False Discovery Rate*) de 0.01, PSM (*peptide spectrum match*) FDR de 0.05 y oxidación de



metionina como modificación variable. Posteriormente se eliminaron los péptidos provenientes de contaminantes comunes en este tipo de preparaciones. Finalmente, la intensidad de cada péptido identificado ( $X_{IC}$ ) fue normalizada a la suma de las intensidades de los péptidos secuenciados ( $\sum X_{IC}(\text{secuenciados})$ ) en esa preparación:  $X_{IC}/\sum X_{IC}(\text{secuenciados})$ .

#### **M.10 Búsqueda de homología por secuencia y predicción del corte por el proteasoma.**

La búsqueda de homología de secuencia entre péptidos derivados de *C. trachomatis* y secuencias derivadas de proteínas humanas se realizó con el software BLASTP 2.2.26+, utilizando la sección de *Homo sapiens* proveniente de la base de datos UniProt/Swiss-Prot (release 07/2012 con 20231 entradas).

Una vez identificadas las secuencias homólogas provenientes del proteoma humano, se sometieron a una predicción del corte producido tanto por el proteasoma constitutivo, como por el inmunoproteasoma. La predicción se realizó en el servidor PCPS (Proteasome Cleavage Prediction Server) disponible en: <http://imed.med.ucm.es/Tools/pcps/index.html> (Diez-Rivero *et al.*, 2010b).

#### **M.11 Predicción del transporte de ligandos por TAP.**

Los péptidos provenientes de la caracterización del peptidoma constitutivo de HLA-A\*29 se sometieron a un análisis de predicción del transporte por TAP utilizando el servidor TAPREG disponible en: <http://imed.med.ucm.es/Tools/TAPREG/index.html> (Diez-Rivero *et al.*, 2010a).

#### **M.12 Predicción de la afinidad a HLA-A\*29:02.**

La afinidad teórica de los ligandos de A\*29:02 se calculó utilizando el servidor NetMHCcons 1.1 disponible en: <http://www.cbs.dtu.dk/services/NetMHCcons/> (Karosiene *et al.*, 2012). Este servidor utiliza tres métodos distintos para estimar de manera más precisa la afinidad teórica por el MHC para péptidos entre 8-15 residuos. Las diferencias estadísticas se calcularon utilizando el test de Mann-Whitney.

#### **M.13 Análisis de hidropatía.**

Se llevó a cabo para los ligandos de A\*29:02 utilizando el score de GRAVY (*grand average of hydropathicity*), el cual emplea el índice de hidropatía implementado por Kyte y Doolittle (Kyte y Doolittle, 1982). Un score alto de GRAVY indica una alta hidrofobicidad del péptido analizado. Las diferencias estadísticas se calcularon utilizando el test de Mann-Whitney.

## **M.14 Simulación dinámica.**

### **M.14.1 Modelización por homología.**

Los modelos tridimensionales entre B\*27:05/ $\beta_2m$  y DNAP(211-221), DNAP(211-223) o B27(309-320) se construyeron mediante modelización por homología. Se alinearon un total de 23 estructuras de los complejos HLA-B\*27/péptido, obtenidas por cristalografía de rayos X, utilizando el software MAFFT (Katoh *et al.*, 2002). Debido a que todos los complejos contenían nonámeros, los alineamientos de estos péptidos con los más largos se realizaron incluyendo espacios en las posiciones internas. Las cuatro posiciones N-terminales y las dos C-terminales fueron restringidas en su unión, en cambio en las otras posiciones se les permitió cierta flexibilidad. El complejo B\*27:05 con el péptido pVIPR(400-408), en su conformación canónica (PDB: 10GT) (Hülsmeier *et al.*, 2004), se seleccionó como modelo debido a su alta resolución (1.47 Å) y se utilizó para la modelización por homología con el software MODELLER.

### **M.14.2 Preparación de los sistemas y simulaciones de dinámica molecular.**

Para cada complejo HLA-B\*27/péptido, la preparación del sistema consistió en: 1) añadir los átomos pesados y de hidrógeno (Dolinsky *et al.*, 2007) para asignar los tipos de átomos y cargas de acuerdo al campo de fuerza AMBER ff10 (Hornak *et al.*, 2006) y determinar el estado de protonación de los residuos ionizables a pH 7, 2) emplear el módulo tleap del paquete AmberTools (Case *et al.*, 2005) para sumergir cada sistema en una caja TIP3P de 10 Å (Jorgensen *et al.*, 1983) de moléculas de agua y contraiones Na<sup>+</sup>, 3) minimización de energía de iones y moléculas de agua usando el método del gradiente conjugado de 3000 pasos mientras las coordenadas en los complejos se mantuvieron constantes, seguido por un equilibrio a 298K durante 10 ps, manteniendo las restricciones, 4) disminuir las restricciones progresivamente, minimizando la energía de todo el complejo, incluidas las moléculas de agua y los iones.

Las simulaciones de dinámica molecular (MD) se realizaron a partir de las estructuras con su energía minimizada. Los cálculos se realizaron usando el software NAMD 2.8 (Phillips *et al.*, 2005) a una temperatura constante de 298K y presión de 1 atm. Se calcularon las fuerzas en rangos cortos y largos, cada uno o dos pasos de tiempos (cada paso: 2 fs), restringiendo los enlaces covalentes que involucran átomos de hidrógeno a sus valores de equilibrio. Las interacciones electrostáticas de rango largo se evaluaron usando una malla de partículas por la aproximación de Ewald (Darden *et al.*, 1993). El sistema se calentó hasta 298K y se equilibró a esta temperatura durante 200 ps. El equilibrado se llevó a cabo bajo condiciones restrictivas armónicas de todos los átomos pesados. Estas restricciones fueron reducidas gradualmente hasta que fueron prácticamente eliminadas.

Las estructuras equilibradas fueron posteriormente simuladas durante 50 ps adicionales con restricciones mínimas. Estos fueron los puntos de partida para los 30 ns de producción de MD, periodo durante el cual el sistema de coordenadas fue colectado cada 2 ps para los análisis posteriores.

#### **M.14.3 Análisis de las trayectorias de MD.**

La estabilidad de cada complejo durante la trayectoria, se evaluó calculando el RMSD (*root mean square deviation*) de los C $\alpha$ , usando como referencia las estructuras iniciales. Adicionalmente, el RMSF (*root mean square fluctuation*) de cada residuo, relativo al correspondiente valor medio, fue calculado para cada punto (*snapshot*), referido a su estructura inicial. Los análisis posteriores se llevaron a cabo agrupando (*clustering*) cada espacio conformacional durante el tiempo de producción de la trayectoria (últimos 10 ns), usando el módulo ptraj del paquete AmberTools, las *snapshots* descritas anteriormente y un algoritmo de ligamiento promedio basado en los átomos de carbono del esqueleto peptídico. Los cálculos electrostáticos de *Poisson-Boltzmann* para las estructuras representativas de cada *cluster* se realizaron utilizando el software APBS (*Adaptive Poisson-Boltzmann Solver*) (Baker *et al.*, 2001; Dolinsky *et al.*, 2004). Las constantes dieléctricas fueron 4 y 80 para las proteínas y el solvente, respectivamente. Otros parámetros se dejaron por defecto. La energía libre de unión entre cada péptido y la molécula de B\*27:05 se calculó utilizando la aproximación MM-ISMSA (Klett *et al.*, 2012). Además se calculó la descomposición de la energía libre de unión siguiendo el esquema desarrollado en MM-ISMSA para determinar los residuos responsables de la interacción con B\*27:05. La energía libre de unión media, y su desviación estándar, sigue una distribución normal y se calculó para cada trayectoria usando el software R (R Development Core Team, 2012). Los contactos entre residuos se analizaron siguiendo la metodología MM-ISMSA.



## **RESULTADOS**



## RESULTADOS I.

### R.1 ClpC

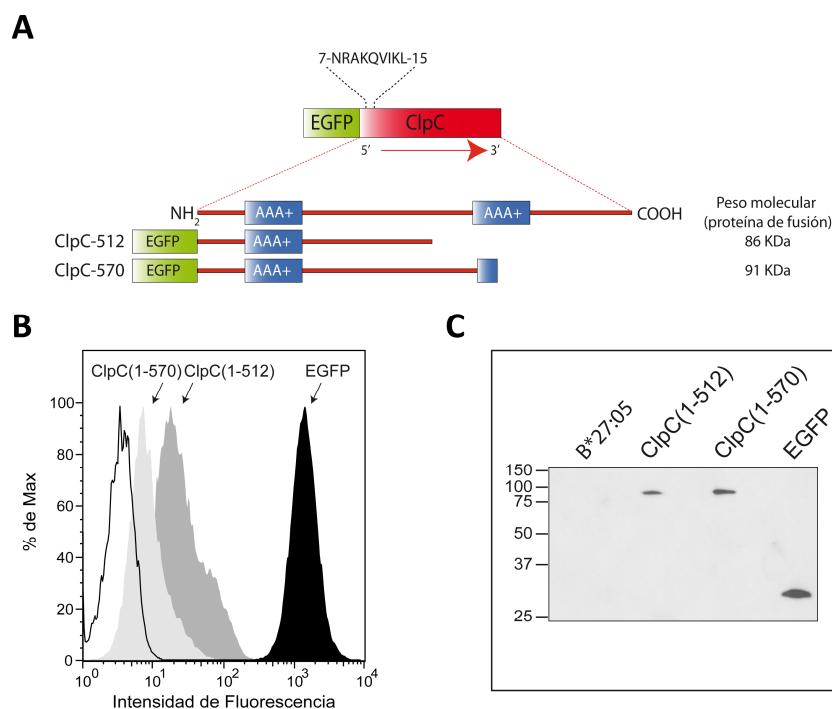
#### R.1.1 Expresión de las proteínas de fusión de ClpC en células C1R-B\*27:05.

ClpC es una chaperona dependiente de ATP que participa en la degradación de proteínas bacterianas. Este proceso es realizado por una proteasa denominada ClpCP (Dougan *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2011), que consta de 854 aa y posee dos dominios de unión a nucleótidos AAA+, encargados de unir ATP. La búsqueda de ligandos de esta proteína, procesados endógenamente y presentados por HLA-B\*27, estuvo motivada porque un epítipo, ClpC(7-15), fue reconocido *in vitro*, como péptido sintético, por CTLs de pacientes HLA-B\*27+ infectados con *C. trachomatis* que desarrollaron ReA (Kuon *et al.*, 2001).

En un primer intento, solo se consiguió la expresión transitoria de esta proteína y fue imposible generar una línea celular estable para proceder con los estudios peptidómicos. Con el fin de eliminar cualquier tipo de interferencia funcional entre ClpC y la maquinaria celular, diseñamos dos construcciones en las cuales se eliminó parcial, o totalmente, el dominio AAA+ C-terminal (**Figura R1A**).

Cada una de las construcciones se expresó de manera estable en células C1R-B\*27:05 (**Figura R1B**) y se determinó mediante Western blot que el tamaño de la proteína de fusión fuese el correcto para cada una de ellas (**Figura R1C**). En base a los niveles de expresión de la proteína de fusión, se decidió continuar los análisis con el transfectante ClpC(1-512).

En un primer intento se efectuó un análisis comparativo de los repertorios peptídicos provenientes de C1R-B\*27:05 y de ClpC(1-512), mediante MALDI-TOF. Este análisis se basó en la comparación sistemática de las distintas especies moleculares en cada fracción de HPLC, y que presentan un *rt* similar, siguiendo la estrategia esquematizada en la **Figura R2**. A pesar de que mediante este método se identificaron diversos ligandos provenientes de otras proteínas de *Chlamydia* (Cragolini y López de Castro, 2008; Cragolini *et al.*, 2009), en este análisis no se detectaron péptidos diferenciales provenientes de ClpC.



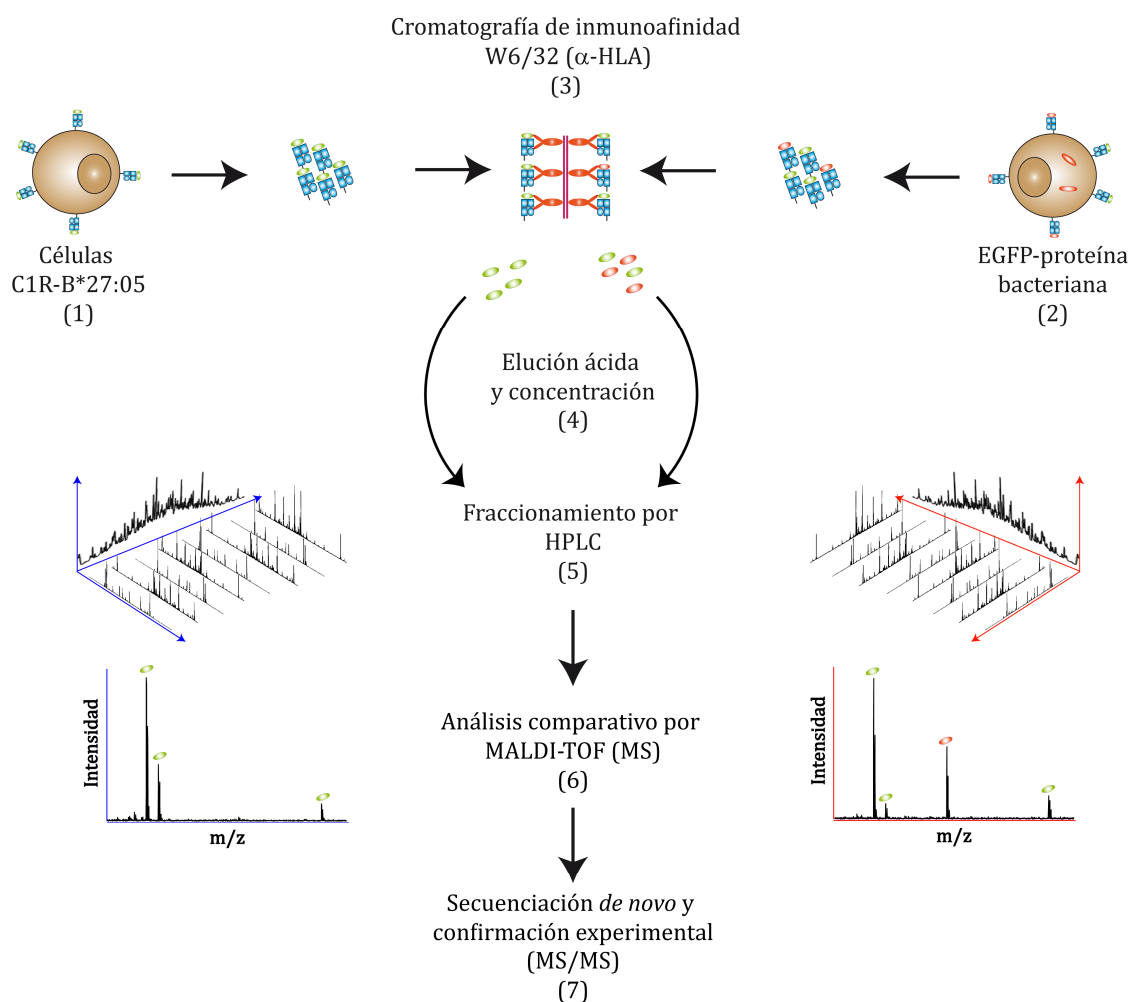
**Figura R1: Expresión de las proteínas de fusión de ClpC en células C1R-B\*27:05. A)** Esquema de las construcciones de ClpC y de las proteínas de fusión de EGFP-ClpC. **B)** Fluorescencia asociada a EGFP medida por citometría de flujo en los transfectantes de la proteína de fusión (gris), células C1R-B\*27:05 sin transfectar (blanco) o células transfectadas solo con EGFP (negro). **C)** Western blot que muestra la expresión estable de las proteínas de fusión en los respectivos transfectantes. El inmunoblot se realizó utilizando lisados totales.

### R.1.2 Un péptido derivado de ClpC distinto del epítipo predicho es procesado endógenamente y presentado por HLA-B\*27:05.

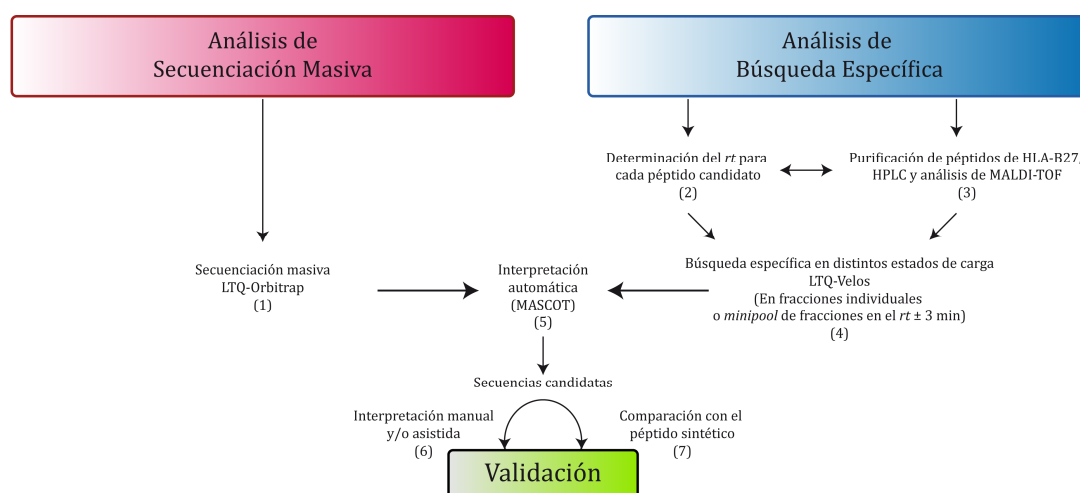
Debido a las insuficiencias de la estrategia basada en MALDI-TOF, se implementaron nuevos métodos de búsqueda utilizando técnicas de MS de mayor sensibilidad. La nueva estrategia consistió en dos etapas (**Figura R3**). Primero, secuenciación masiva del pool peptídico proveniente de C1R-B\*27:05, y de ClpC (1-512), utilizando un espectrómetro de masas LTQ-Orbitrap. Segundo, una búsqueda específica, para lo cual se determinó el *rt* de los ligandos candidatos utilizando péptidos sintéticos. Las fracciones individuales, o un *minipool* de las fracciones correspondientes al *rt* del péptido sintético ( $rt \pm 3$  min) de los respectivos peptidomas fraccionados por HPLC, se analizaron buscando iones específicos en distintos estados de carga en un espectrómetro LTQ-Velos. Los espectros MS/MS provenientes del LTQ-Velos, o LTQ-Orbitrap, se interpretaron automáticamente utilizando como motor de búsqueda el software Mascot.



Cada secuencia candidata fue revisada manualmente y asistida por la herramienta MS-Product. La confirmación final se realizó comparando el espectro MS/MS del péptido asignado con el espectro MS/MS del respectivo péptido sintético.



**Figura R2: Estrategia experimental basada en MALDI-TOF para la detección de ligandos de *Chlamydia* restringidos por HLA-B\*27.** Se aíslan los repertorios peptídicos unidos a HLA-B27 a partir de transfectantes estables C1R-B\*27:05 (1), que expresan o no la proteína de fusión EGFP-proteína bacteriana (2). Tras la purificación por cromatografía de inmunoafinidad (3), se eluyen en medio ácido los péptidos unidos a HLA-B27 (4). Posteriormente, los *pools* peptídicos se fraccionan mediante HPLC bajo las mismas condiciones (5) y cada una de las fracciones se analiza por espectrometría de masas de MALDI-TOF. La identificación de péptidos bacterianos diferenciales se lleva a cabo realizando una comparación sistemática de los espectros de masas de las fracciones de HPLC correlativas (6). Finalmente se obtiene la secuencia del péptido diferencial por análisis de MS/MS y se compara con el espectro MS/MS del respectivo péptido sintético (7).



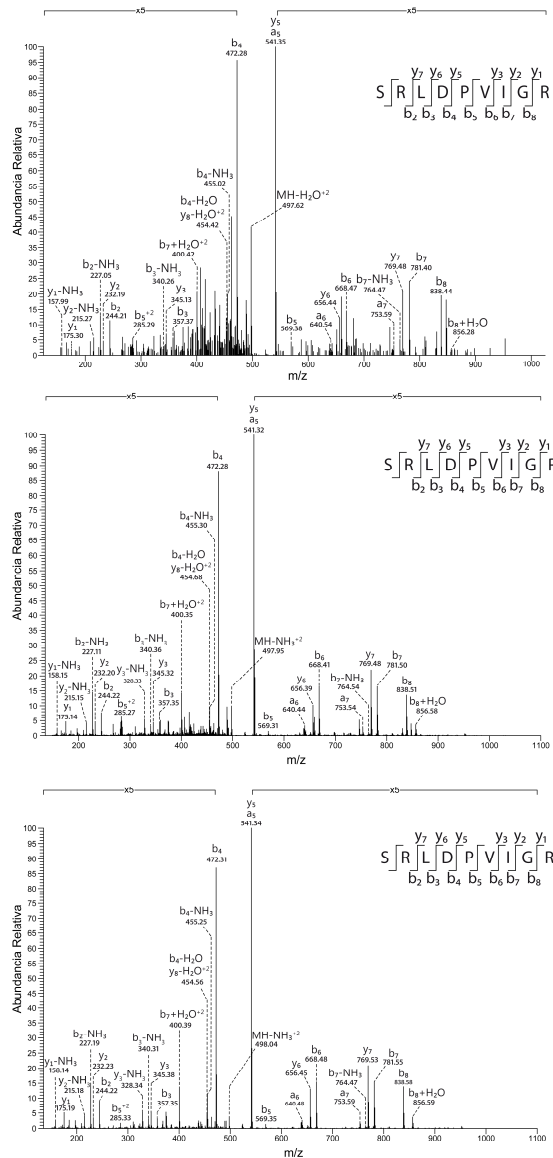
**Figura R3: Estrategia experimental para la detección de ligandos de *Chlamydia* restringidos por HLA-B\*27.** El pool peptídico de células C1R-B\*27:05 que expresan, o no, la construcción bacteriana se analizan directamente mediante LC-MS/MS en un espectrómetro LTQ-Orbitrap (1). Alternativamente, se realiza una búsqueda específica, determinando el *rt* del péptido sintético (2), analizando las correspondientes fracciones individuales, o un *minipool* de las fracciones cercanas al *rt* del péptido sintético, del *pool* peptídico derivado de HLA-B\*27 fraccionado por HPLC (3) y buscando los iones específicos, en diferentes estados de carga, en un espectrómetro LTQ-Velos (4). Los espectros MS/MS se analizan utilizando el software Mascot (5). Cada secuencia candidata es revisada manualmente y asistida por la herramienta MS-product (6). La confirmación final se realiza comparando el espectro MS/MS de la secuencia asignada, con el obtenido experimentalmente para el péptido sintético (7).

Esta nueva estrategia permitió detectar un péptido derivado de ClpC, SRLDPVIGR, correspondiente a los residuos 203-211 (**Figura R4A**). ClpC(203-211) posee el motivo canónico de unión a HLA-B\*27, R en posición 2. La confirmación final del origen bacteriano de este péptido provino de las búsquedas del espectro MS/MS y de la secuencia contra el proteoma humano, las cuales no dieron resultados positivos.

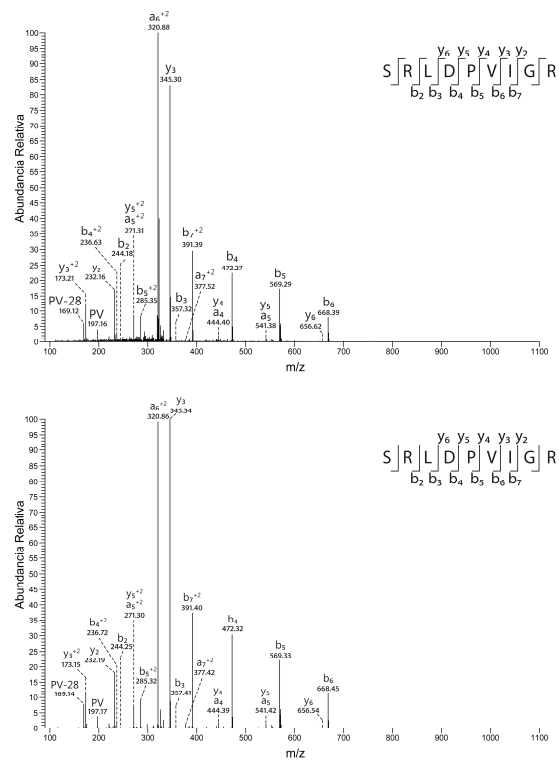
Para determinar si este péptido fue pasado por alto en el análisis realizado por MALDI-TOF, o si co-eluyó con un péptido endógeno proveniente de B\*27:05, se determinó el *rt* del péptido sintético en las mismas condiciones experimentales utilizadas para la fragmentación del peptidoma. Las fracciones correspondientes al  $rt \pm 3$  min se fragmentaron utilizando un espectrómetro LTQ-Velos. Los iones parentales con una relación *m/z* de 506.80 y 338.30, compatibles con los iones  $[M+2H]^{+2}$  y  $[M+3H]^{+3}$  de ClpC(203-211) fueron detectados en la fracción 142. El espectro MS/MS de la forma  $[M+2H]^{+2}$  obtenido en el LTQ-Velos es prácticamente idéntico al obtenido utilizando el LTQ-Orbitrap y al del péptido sintético (**Figura R4A**). La asignación de la secuencia se confirmó mediante la identidad del espectro MS/MS del ion con *m/z* 338.20 al obtenido del péptido sintético en su forma  $[M+3H]^{+3}$  (**Figura R4B**). Un análisis comparativo posterior realizado sobre la fracción 142, y las adyacentes, de ClpC(1-512) y de C1R-B\*27:05, confirmó la presencia de un péptido derivado de B\*27:05, con una *m/z* de 1012.53, prácticamente idéntico al  $[M+H]^+$  de ClpC(203-211) y que co-eluía con este en

nuestras condiciones experimentales. Este hecho explica el fallo en detectar el péptido de *Chlamydia* en el análisis comparativo por MALDI-TOF.

**A**



## B



**Figura R4: Identificación del ligando de *C. trachomatis* restringido por B\*27:05, SRLDPVIGR.**

**A)** Espectro MS/MS del ion  $[M+2H]^{+2}$  en una relación  $m/z$  506.80 detectado en el espectrómetro LTQ-Orbitrap a partir del peptidoma de HLA-B\*27 sin fraccionar por HPLC (panel superior), o en el LTQ-Velos a partir de la fracción 142 del peptidoma fraccionado por HPLC (panel medio) y el péptido sintético SRLDPVIGR, correspondiente a los residuos 203-211 de la proteína ClpC (panel inferior). **B)** Espectro MS/MS del ion  $[M+3H]^{+3}$  en una relación  $m/z$  de 338.20 detectado en un pool de fracciones de HPLC comprendidas entre el  $rt \pm 3$  min del péptido sintético, usando un espectrómetro LTQ-Velos (panel superior) y del respectivo péptido sintético correspondiente a los residuos 203-211 de la proteína ClpC (panel inferior).

ClpC(203-211) no había sido detectado como posible epítipo de HLA-B\*27 en estudios previos en que se escaneó el proteoma de *C. trachomatis* para la búsqueda de epítipos reconocidos *in vitro* por células T CD8<sup>+</sup> de pacientes (Kuon *et al.*, 1997; Kuon y Sieper, 2003b). Sin embargo, dichos estudios habían predicho la existencia de otro epítipo de esta proteína: ClpC(7-15), NRAKQVIKL.

Puesto que este péptido no fue detectado en nuestro estudio, se procedió a buscar específicamente este ligando y una variante C-terminal del mismo, NRAKQVIKLAK, con el motivo de anclaje a B\*27:05. Para ello, ambos péptidos fueron sintetizados y determinados sus *rt*. Las fracciones correspondientes al *rt*  $\pm$  3 min fueron utilizadas para la búsqueda específica en los ratios m/z correspondientes a  $[M+2H]^{+2}$  y  $[M+3H]^{+3}$  de ambos péptidos. Estos análisis no mostraron ningún patrón MS/MS, atribuible a la presencia de ClpC(7-15) o ClpC(7-17).

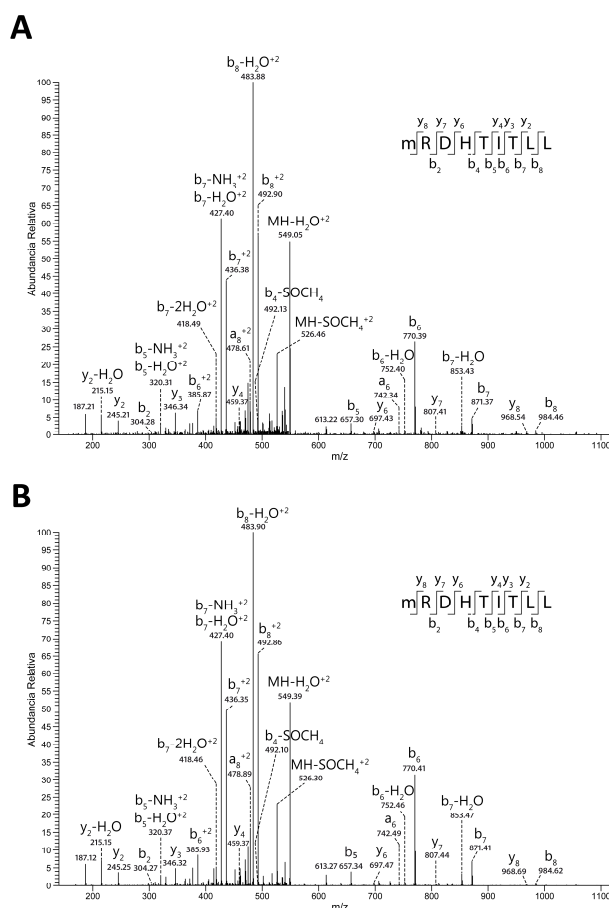
## R.2 NQRA

### R.2.1 Un péptido derivado de NQRA, reconocido por CTLs de pacientes con ReA, es procesado endógenamente y presentado por HLA-B\*27:05.

En un estudio previo de nuestro laboratorio, basado en la comparación sistemática por MALDI-TOF, se detectó un ligando proveniente de la proteína bacteriana NQRA (*Na(+)-translocating NADH-quinone reductase subunit A*) (Cragolini *et al.*, 2009), no predicho por estudios *in vitro*. Sin embargo, no se encontró un epítipo de esta proteína que era reconocido, como péptido sintético, por células T CD8<sup>+</sup> de pacientes (Kuon y Sieper, 2003b). Por ello decidimos utilizar la estrategia experimental de mayor sensibilidad utilizada en ClpC para reanalizar la posible generación endógena de este epítipo.

La generación y caracterización de C1R-B\*27:05 transfectada con la proteína de fusión NQRA(1-465) ha sido descrita previamente (Cragolini *et al.*, 2009). La búsqueda se centró directamente en la identificación dirigida del péptido NQRA(330-338), y no en la secuenciación masiva de los ligandos provenientes de esta línea. Para ello se determinó el *rt* del péptido sintético y se utilizaron las fracciones correspondientes al *rt*  $\pm$  3 min del peptidoma de NQRA(1-465) previamente fraccionado por HPLC. La búsqueda se realizó en modo dual, utilizando un LTQ-Velos, tal como se describe en Materiales y Métodos.

Uno de los iones de intensidad más alta encontrados durante el análisis de *full MS*, correspondió a una relación m/z de 558.33, que es compatible con la especie  $[M+2H]^{+2}$  de la forma oxidada de MRDHTITLL (**Figura R5A**). La confirmación de la secuencia y asignación del espectro MS/MS, se realizó por comparación con el espectro MS/MS de la forma oxidada del péptido sintético respectivo (**Figura R5B**).



**Figura R5: Identificación del epítipo de *C. trachomatis* restringido por B\*27:05, mRDHTITLL.**  
**A)** Espectro MS/MS del ion  $[M+2H]^{+2}$  en una relación m/z de 558.33 detectado en el espectrómetro LTQ-Velos desde un pool de fracciones de HPLC comprendidas entre el  $rt \pm 3$  min del péptido sintético.  
**B)** Forma oxidada del péptido sintético que comprende los residuos 330-338 de la proteína NQRA.

Este resultado confirma el procesamiento endógeno y presentación del epítipo NQRA(330-338) por HLA-B\*27:05. Este es el segundo epítipo de células T, restringido por HLA-B\*27:05 y relevante en pacientes con ReA inducida por *C. trachomatis*, cuya generación ha sido demostrada en células vivas.

### **R.3 Los péptidos derivados de ClpC y NQRA presentan alta homología de secuencia con péptidos humanos.**

Con el objetivo de identificar secuencias humanas homólogas a los epítopos bacterianos ClpC(203-211) y NQRA(330-338) se realizó una búsqueda por alineamiento de sus secuencias con el proteoma humano. Esta búsqueda se llevó a cabo utilizando tres condiciones: 1) la identidad de residuos debe ser >50%, 2) las secuencias deben contener el motivo de unión canónico de HLA-B\*27, R en posición 2, y 3) los residuos presentes en las posiciones de anclaje secundarias P1, P3 y PC deben aparecer en el peptidoma de HLA-B\*27 con una frecuencia >1%. Una vez localizadas las secuencias apropiadas, se realizó un

análisis de predicción de corte por el proteasoma e inmunoproteasoma. Ambos análisis mostraron que existen múltiples secuencias humanas con alta homología a los péptidos bacterianos y que además poseen un *score* de predicción de corte proteasómico alto (>0.5), lo cual las hace compatibles con la generación del extremo C-terminal por el proteasoma y/o inmunoproteasoma (**Tabla R1**).

Secuencias homólogas al ligando ClpC(203-211): <b>SRLDPVIGR</b>					
Número de Acceso	Proteína	Secuencia <sup>a</sup>	Identidad (%)	PCS <sup>b</sup>	ICS <sup>b</sup>
Q6V0I7	Protocadherin Fat 4	<u>FRLDPV</u> <u>SGR</u>	77	0.42	0.34
Q8TDY2	RB1-inducible coiled-coil protein 1	<u>SRLDPRI</u> <u>IR</u>	77	0.07	0.50
Q15493	Regucalcin	<u>IRLDPVT</u> <u>GK</u>	66	0.51	0.54
Q9UER7	Death domain-associated protein 6	<u>SRLDEVI</u> <u>SK</u>	66	0.36	0.52
Q5VU43	Myomegalin	<u>SRLEEVL</u> <u>GR</u>	66	0.65	0.50
Q14406	Chorionic somatomammotropin hormone-like 1	<u>SRLEPVR</u> <u>FL</u>	55	0.77	0.68
Q8N3J3	Uncharacterized protein C17orf53	<u>GRLRPV</u> <u>SSR</u>	55	0.07	0.50
Q92935	Exostosin-like 1	<u>LRLDPVL</u> <u>FK</u>	55	0.17	0.52
Q16394	Exostosin-1	<u>MRLDPVL</u> <u>FK</u>	55	0.17	0.52
Q13753	Laminin subunit gamma-2	<u>QRLDPVY</u> <u>FV</u>	55	0.55	0.58
Q96BZ8	Leukocyte receptor cluster member 1	<u>SRLDPL</u> <u>REM</u>	55	0.55	0.60
Q86UR5	Regulating synaptic membrane exocytosis protein 1	<u>SRLDPSS</u> <u>AV</u>	55	0.53	0.58
Q6ZT12	E3 ubiquitin-protein ligase UBR3	<u>SRLDPDY</u> <u>FI</u>	55	0.61	0.55
Secuencias homólogas al ligando NQRA(330-338): <b>MRDHTITLL</b>					
Número de Acceso	Proteína	Secuencia <sup>a</sup>	Identidad (%)	PCS <sup>b</sup>	ICS <sup>b</sup>
P48651	Phosphatidylserine synthase 1	<u>YRPHTITLL</u> <sup>c</sup>	77	0.67	0.64
P18510	Interleukin-1 receptor antagonist protein	<u>LRSHLITLL</u>	66	0.53	0.56
Q9Y2E8	Sodium/hydrogen exchanger 8	<u>FRDHKIT</u> <u>PK</u>	55	0.23	0.53
Q2VPK5	Cytoplasmic tRNA 2-thiolation protein 2	<u>MRDHTL</u> <u>KEV</u>	55	0.55	0.58
Q6NSI8	Uncharacterized protein KIAA1841	<u>VRDHMTL</u> <u>R</u>	55	0.50	0.51

**Tabla R1: Secuencias humanas con alta homología a los ligandos de *C. trachomatis* restringidos por HLA-B\*27.** <sup>a</sup>Los residuos idénticos en los péptidos bacterianos se muestran subrayados. <sup>b</sup>Scores de corte por el proteasoma constitutivo (PCS) y el inmunoproteasoma (ICS). Los valores mayores de 0.5 indican una mayor probabilidad de generar el extremo C-terminal del péptido. <sup>c</sup>Este péptido contiene prolina en P3, pero se muestra debido a su alta homología con el péptido bacteriano y el alto score de corte por el proteasoma.

#### R.4 DNA Primasa

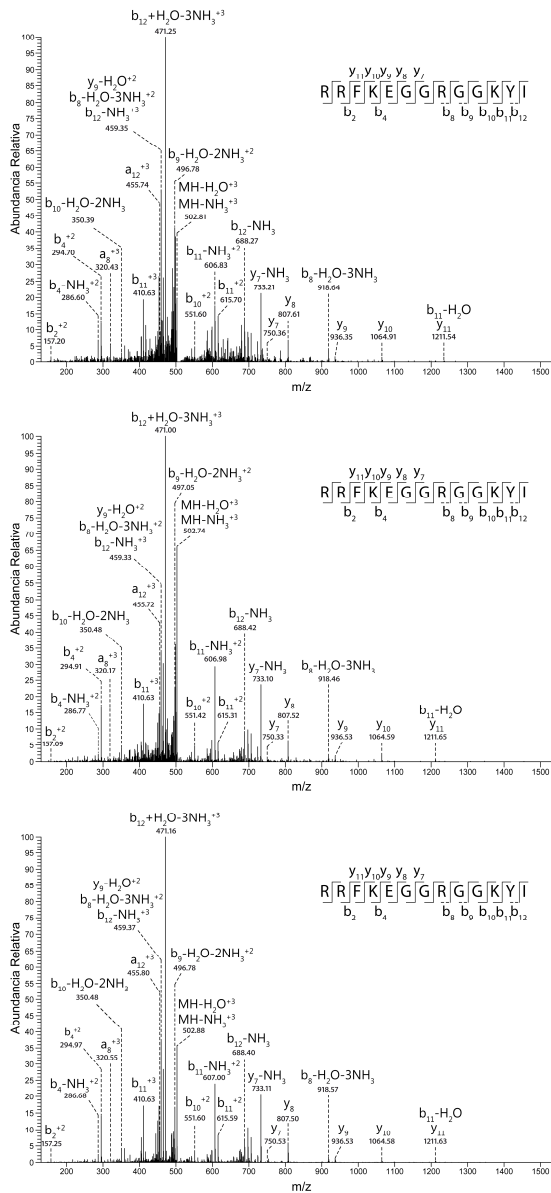
##### R.4.1 Un nuevo péptido derivado de DNAP es endógenamente presentado por HLA-B\*27:05.

La utilización de la nueva estrategia experimental resultó en la confirmación del procesamiento y presentación de dos nuevos epítomos derivados de *C. trachomatis*. Es por ello que se realizó un nuevo análisis de la línea celular DNAP(90-450), la cual se obtuvo previamente por transfección de la DNA primasa de *C. trachomatis* en la línea celular C1R-B\*27:05, con el objetivo de encontrar algún péptido derivado de esta proteína bacteriana, que se hubiere omitido en el análisis previo (Cragolini y López de Castro, 2008), o que no fuese detectado debido a la sensibilidad de los espectrómetros utilizados en ese momento. El análisis se realizó en el peptidoma derivado de la línea celular DNAP(90-450), utilizando la estrategia de secuenciación masiva en el espectrómetro LTQ-Orbitrap. En este análisis se encontró un ion con una relación  $m/z$  de 508.62, compatible con la especie  $[M+3H]^{+3}$  de la secuencia RRFKEGGRGKYI, DNAP(211-223) (**Figura R6A**).

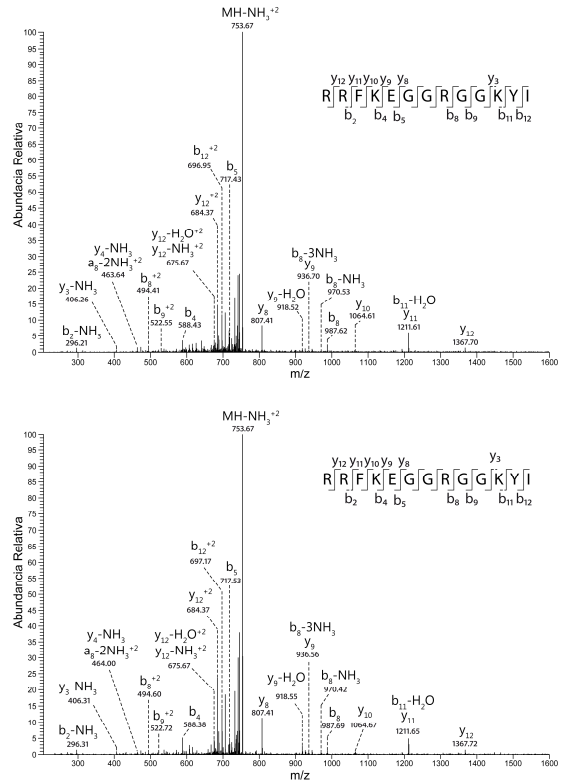
Este péptido es dos residuos más largo que otro identificado previamente para esta proteína, DNAP(211-221) (Cragolini y López de Castro, 2008). Para su confirmación se procedió a buscar de manera dirigida el péptido dentro del peptidoma fraccionado de esta línea celular. Para ello se monitorizaron los iones  $[M+H]^+$ ,  $[M+2H]^{+2}$  y  $[M+3H]^{+3}$ , provenientes de la secuencia DNAP(211-223), dentro de un *minipool* de fracciones correspondientes al  $rt \pm 3$  min. Este análisis mostró la presencia de dos iones con una relación  $m/z$  de 508.62 y 762.43, los cuales corresponden a las especies  $[M+3H]^{+3}$  y  $[M+2H]^{+2}$ , respectivamente (**Figura R6A y R6B**).

La identidad de esta secuencia se confirmó por comparación de los espectros MS/MS con los obtenidos del péptido sintético en las relaciones  $m/z$  determinados anteriormente (**Figura R6A y R6B**). Este es el segundo ligando de la DNA primasa de *C. trachomatis* que presenta una alta homología de secuencia con un ligando natural de HLA-B\*27, RRKSSGGKGGSY, B27(309-320), procedente del procesamiento endógeno de la HC de la propia molécula (Ramos *et al.*, 2002).

A



B



**Figura R6: Identificación del ligando de *C. trachomatis* restringido por B\*27:05, RRFKEGGRGGKYI.** **A)** Espectro MS/MS del ion  $[M+3H]^{+3}$  en una relación m/z de 508.62 detectado en el espectrómetro LTQ-Orbitrap a partir del peptidoma de HLA-B\*27 sin fraccionar por HPLC (panel superior), o en el LTQ-Velos a partir de un pool de fracciones de HPLC correspondientes al  $rt \pm 3$  min del péptido sintético (panel medio) y el péptido sintético RRFKEGGRGGKYI, correspondiente a los residuos 211-223 de la proteína DNAP (panel inferior). **B)** Espectro MS/MS del ion  $[M+2H]^{+2}$  en una relación m/z de 762.43 detectado en un pool de fracciones de HPLC correspondientes al  $rt \pm 3$  min del péptido sintético, usando un espectrómetro LTQ-Velos (panel superior) y del respectivo péptido sintético correspondiente a los residuos 211-223 de la proteína DNAP (panel inferior).



## ***R.5 Conformación de los ligandos de DNAP unidos a HLA-B\*27: Estudios de simulación dinámica.***

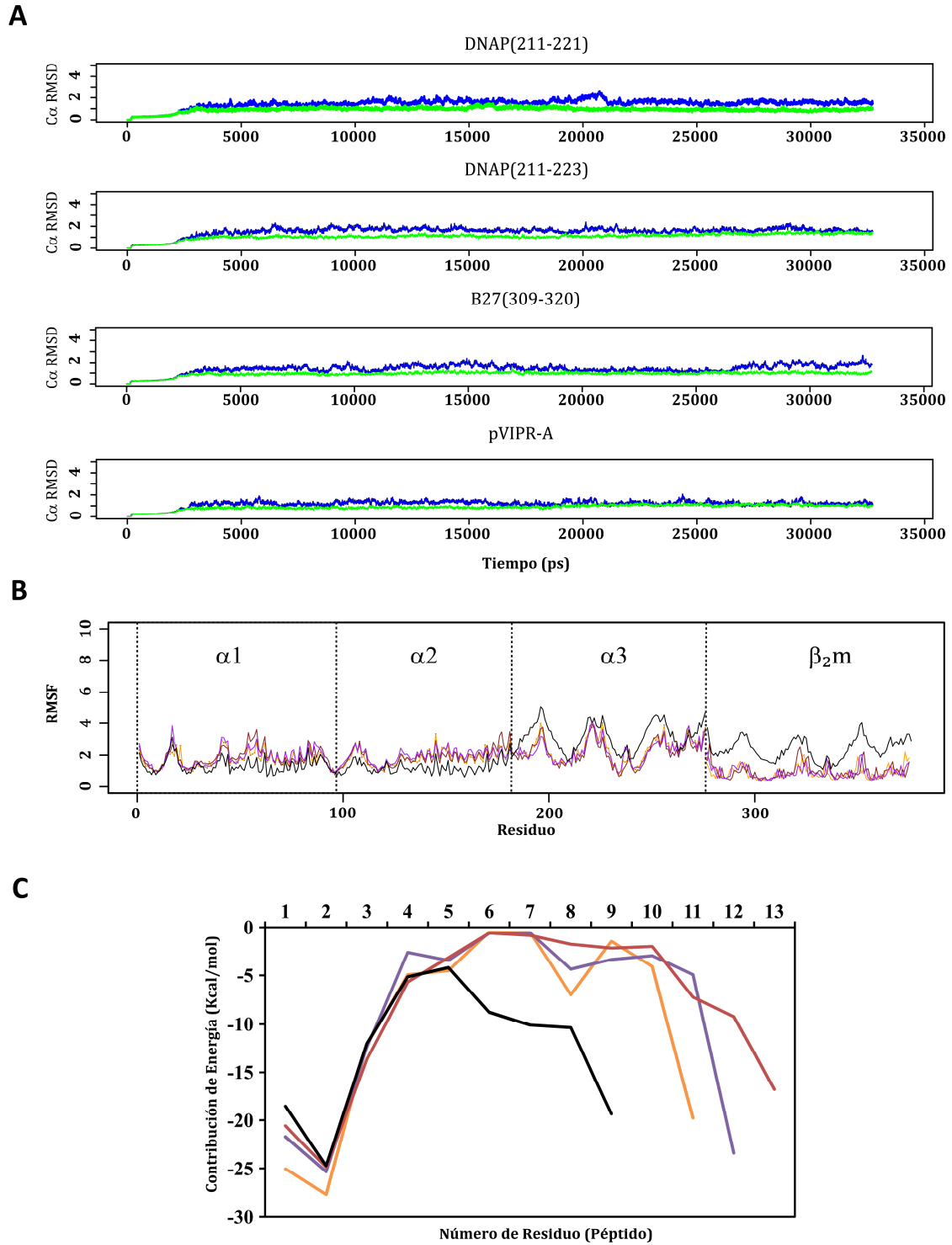
### ***R.5.1 Los péptidos derivados de DNAP muestran homología conformacional con un péptido endógeno derivado de HLA-B\*27.***

Para explorar la posibilidad de mimetismo molecular entre los péptidos derivados de la DNA primasa, DNAP(211-221) y DNAP(211-223), y el péptido endógeno B27(309-320) se realizó una comparación a nivel estructural de estos ligandos unidos a HLA-B\*27. Esta comparación fue realizada utilizando técnicas de dinámica molecular, para lo cual fueron creados los complejos péptido/B\*27:05/ $\beta_2m$  mediante modelización por homología. Se utilizó como estructura control la del péptido pVIPR(400-408), en su forma canónica, en complejo con B\*27:05 y  $\beta_2m$  (pVIPR-A). Las simulaciones de dinámica molecular se llevaron a cabo durante 30 ns y posteriormente se analizó la estabilidad de las trayectorias obtenidas.

La simulación dinámica mostró que el RMSD medio de los C $\alpha$  y el RMSF medio de los residuos de B\*27:05 y  $\beta_2m$  fueron similares en los tres complejos analizados (**Figura R7A** y **R7B**). Sin embargo, los valores de RMSD y RMSF medios para los diferentes péptidos fueron más variables, encontrándose entre 0.58-2.25 Å y 2.0-2.4 Å, respectivamente, dependiendo del complejo analizado (**Figura R8A** y **R8B**). Los valores más altos de RMSF (>3.0 Å) se encontraron en residuos específicos, como R8 en DNAP(211-221), en G6, G7 y K8 en B27(309-320) (**Figura R8B**). La baja fluctuación de RMSD en DNAP(211-223) después de los primeros 5-10 ns de simulación, además de valores bajos de RMSF, relativos a DNAP(211-221) y B27(309-320), sugiere que DNAP(211-223) posee una estructura menos flexible que cualquiera de los otros péptidos analizados (**Figura R8A**).

### ***R.5.2 Los péptidos derivados de DNAP presentan distinta flexibilidad y conformación.***

En una simulación dinámica, se asume que las estructuras llegan a una conformación estable durante el último tiempo de simulación. Por lo cual, se escogieron los últimos 10 ns de cada simulación y se obtuvo una muestra de 5000 estructuras que fueron agrupadas en 5 *clusters* en base a la similitud del RMSD en el esqueleto peptídico. De este *clustering*, se encontraron dos estructuras predominantes para DNAP(211-221), una para DNAP(211-223), tres para B27(309-320) y una para el cristal pVIPR(400-408) utilizado como control.



**Figura R7: Simulación de dinámica molecular de HLA-B\*27:05 y  $\beta_2 m$ , y la contribución individual de los residuos del péptido en la unión a B\*27:05. A)** RMSD del C $\alpha$  (en Å) a lo largo de la trayectoria de simulación comparado con sus estructuras iniciales, HLA-B\*27:05 HC y  $\beta_2 m$  están en azul y verde, respectivamente. **B)** RMSF de los residuos (en Å) de la HC de HLA-B\*27 y  $\beta_2 m$  para cada complejo HLA-B\*27/péptido, DNAP(211-221) (naranja), DNAP(211-223) (marrón), B27(309-320) (violeta) y pVIPR-A (negro). Cerca del 32% de los residuos a lo largo de la HC de B\*27:05, principalmente en  $\alpha 3$ , mostraron valores de RMSF sobre 3.0 Å. **C)** Contribución de cada residuo a la energía libre total de unión del péptido correspondiente de acuerdo a la descomposición de energía de MM-ISMSA: DNAP(211-221) (naranja), DNAP(211-223) (rojo), B27(30-320) (azul) y pVIPR-A (negro).

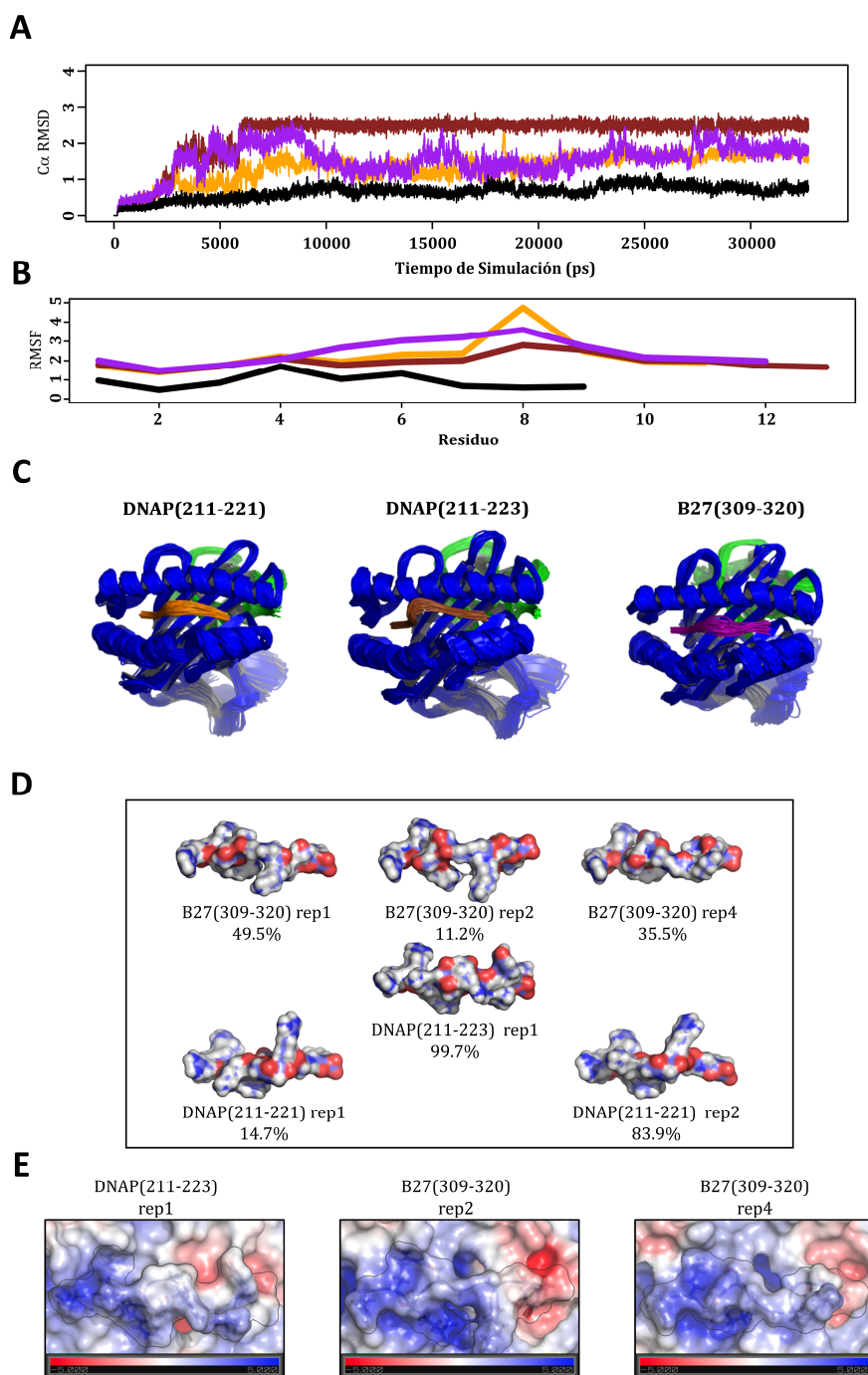
Este resultado indica que existen complejos con mayor o menor flexibilidad, debido a que presentan un mayor o menor número de estructuras representantes (**Tabla R2**). El hecho de que los tres péptidos estudiados presenten diferente flexibilidad, fue confirmado analizando la variabilidad RMSD intra-*cluster* para cada uno de los péptidos. Esta variabilidad se calculó como la distancia media al centroide, es decir, la distancia promedio de todos los miembros del *cluster* al centro geométrico, lo cual muestra la dispersión de los datos dentro de un mismo *cluster*. Se encontraron fluctuaciones pequeñas (0.43), intermedias (0.54) y grandes (0.7) para los *clusters* mayoritarios de DNAP(211-223), DNAP(211-221) y B27(309-320), respectivamente. Estos resultados indican que el péptido B27(309-320) en complejo con B\*27:05 es muy flexible, DNAP(211-221) es menos flexible y DNAP(211-223) es más rígido que cualquiera de los anteriores (**Tabla R2**). El sitio de unión al péptido en B\*27:05, se mantuvo prácticamente constante en todas las estructuras.

Cluster	DNAP(211-221)		DNAP(211-223)		B27(309-320)		pVIPR-A	
	NE <sup>a</sup>	DC <sup>b</sup>	NE <sup>a</sup>	DC <sup>b</sup>	NE <sup>a</sup>	DC <sup>b</sup>	NE <sup>a</sup>	DC <sup>b</sup>
1	734 ( <b>14.7%</b> )	0.51	4987 ( <b>99.7%</b> )	0.43	2473 ( <b>49.5%</b> )	0.7	4984 ( <b>99.7%</b> )	0.35
2	4193 ( <b>83.9%</b> )	0.54	1 (0.0%)	0	559 ( <b>11.2%</b> )	0.75	2 (0.0)	0.26
3	30 (0.6%)	0.43	1 (0.0%)	0	190 (3.8%)	0.67	3 (0.1%)	0.3
4	41 (0.8%)	0.4	3 (0.1%)	0.29	1777 ( <b>35.5%</b> )	0.7	8 (0.2%)	0.3
5	2 (0.0%)	0.4	8 (0.2%)	0.31	1 (0.0%)	0	3 (0.1%)	0.19

**Tabla R2: Análisis de clustering de los péptidos indicados.** <sup>a</sup>Número de estructuras. Los porcentajes de los clusters predominantes (en paréntesis) están en negrita. <sup>b</sup>Distancia al centroide (Å).

Posteriormente, se tomaron un total de 100 estructuras, obtenidas a intervalos de 100 ps durante los últimos 10 ns de simulación, con el fin de obtener una estructura tridimensional homogénea para cada una de las trayectorias (**Figura R8C**). De ellas se obtuvieron estructuras representantes (reps) para cada uno de los *clusters* principales (**Tabla R2**), con el fin de mostrar a un nivel estructural las diferencias y similitudes encontradas en los distintos péptidos analizados.

Para B27(309-320), se encontró que dos representantes, rep1 y rep2, muestran una conformación similar y solo pequeñas diferencias en su superficie molecular. Sin embargo, rep4 mostró diferencias notables con las dos estructuras anteriores. Para DNAP(211-221), las dos conformaciones mayoritarias fueron muy similares entre si y a su vez muy distintas a las encontradas en B27(309-320).



**Figura R8: Análisis estructural de los complejos HLA-B\*27:05/péptido.** **A)** RMSD (en Å) correspondiente a los Cα del péptido durante la trayectoria de dinámica molecular, comparado con las estructuras iniciales, DNAP(211-221) (naranja), DNAP(211-223) (marrón), B27(309-320) (violeta) y pVIPR-A (negro). **B)** RMSF (en Å) por residuo de los cuatro péptidos. El código de colores es igual que en **A**. **C)** Superposición de 100 estructuras obtenidas durante los últimos 10 ns de las trayectorias de dinámica molecular. Se muestran las cadenas principales correspondientes al péptido, la HC de HLA-B\*27:05 (azul) y β<sub>2</sub>m (verde). **D)** Representación de la superficie molecular de las conformaciones representativas para cada *cluster* principal de cada uno de los péptidos (rep) obtenida durante los últimos 10 ns de simulación. Los átomos de oxígeno, nitrógeno y otros están coloreados rojo, azul y blanco, respectivamente. **E)** Análisis de APBS (*Adaptive Poisson-Boltzmann Solver*) para las estructuras más similares encontradas durante el *clustering*. Se muestra la distribución superficial del potencial electrostático. Los potenciales electrostáticos negativos y positivos están coloreados rojo y azul, respectivamente. (Rango ± 5 kcal).

Por último, DNAP(211-223) mostró una similitud significativa con B27(309-320), adquiriendo una estructura tridimensional que se asemeja a una estructura intermedia entre las reps 2 y 4 de este péptido (**Figura R8D**). DNAP(211-223) también mostró una distribución de carga superficial intermedia a la que corresponde a las dos reps de B27(309-320) mencionadas anteriormente (**Figura R8E**).

Utilizando el método de MM-ISMSA se calculó la energía libre de unión de cada uno de los péptidos con B\*27:05, y se determinó la contribución de cada uno de los residuos al total de la energía libre de unión. El residuo 2 mostró la contribución más alta en la interacción con B\*27, ~25 kcal/mol. Los residuos N- y C-terminales contribuyeron con ~20 kcal/mol del total de la energía libre de unión. Los residuos centrales mostraron variaciones y solo pequeñas contribuciones de energía (**Figura R7C**). Estos resultados son concordantes con lo que se conoce experimentalmente de las interacciones de MHC-I y sus ligandos.

## **RESULTADOS II.**

### ***R.6 El peptidoma de HLA-A\*29:02 y el efecto de ERAP1 en su configuración.***

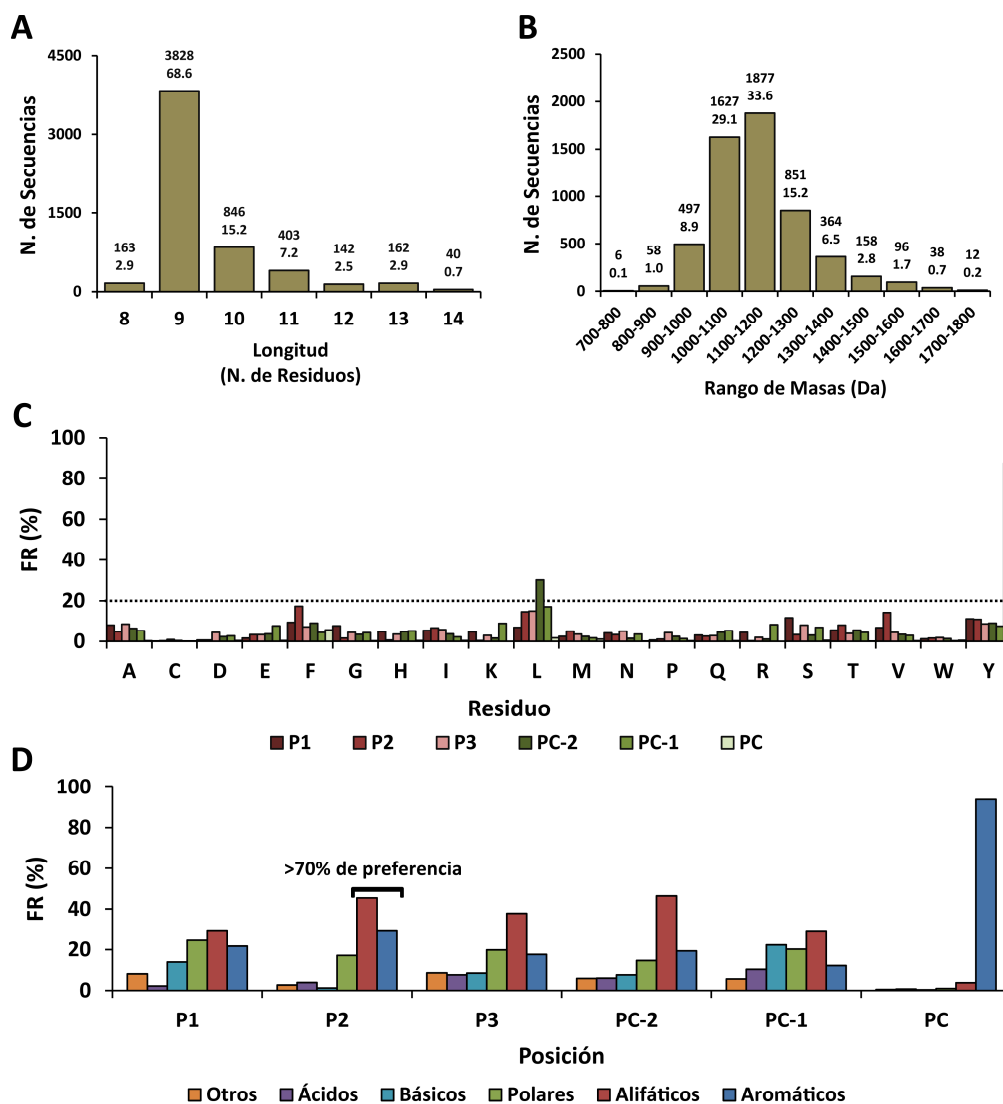
Este trabajo se llevó a cabo porque la BSCR presenta la asociación más fuerte conocida entre un antígeno MHC-I y una enfermedad. Además, ERAP1 participa en una de las últimas etapas del procesamiento peptídico y está en epistasis con distintos alelos de MHC-I ligados a enfermedad. Sin embargo, el peptidoma de HLA-A\*29:02 no ha sido caracterizado extensamente ni se ha determinado el papel de ERAP1 en su generación.

#### ***R.6.1 Caracterización del peptidoma de HLA-A\*29:02.***

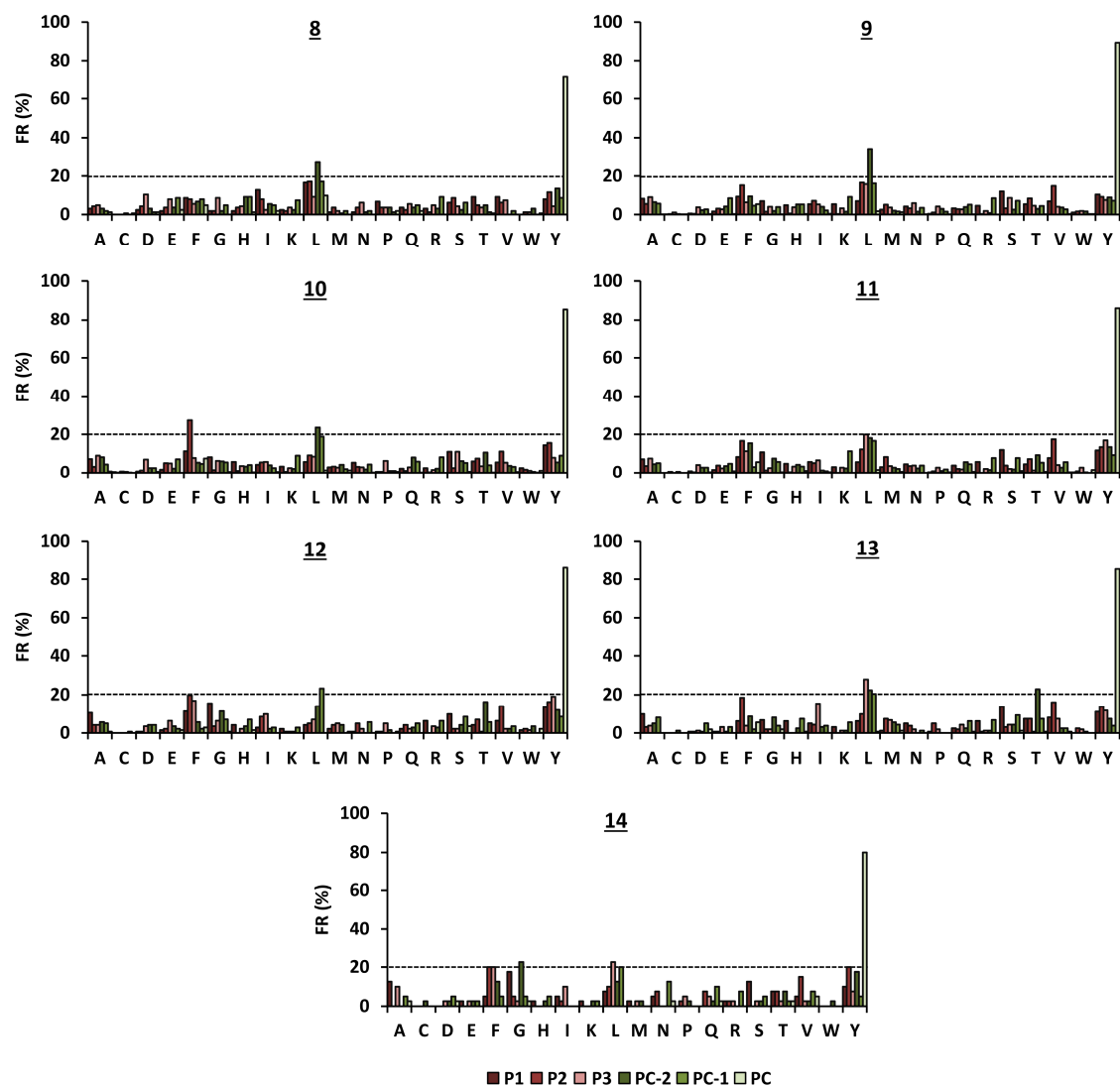
El peptidoma de HLA-A\*29:02 se caracterizó mediante la identificación de los ligandos naturales provenientes de tres líneas celulares linfoblastoides homocigotas para A\*29:02, con distinto fondo genético de ERAP1 y que no expresaban ERAP2. Se obtuvieron un total de 5584 secuencias únicas (ver Tabla Suplementaria en el anexo digital que acompaña esta tesis), cuya longitud (8-14 residuos) y MW (700-1800 Da) mostró una distribución similar a la encontrada en otras moléculas de MHC-I (**Figura R9A y R9B**). El principal motivo de anclaje fue Y en la posición C-terminal (87.7%). Se encontró un motivo de anclaje secundario que consistió en residuos alifáticos/aromáticos en P2 (>70%) y L en la posición PC-2 (30.2%) (**Figura R9C y R9D**). Salvo las excepciones mencionadas, la frecuencia de cualquier residuo fue menor al 20%, lo cual muestra el alto grado de tolerancia de esta molécula en la mayoría de las posiciones. Este patrón se mantuvo globalmente en todas las longitudes, aunque se observaron pequeños cambios en la frecuencia de residuos. (**Figura R10**). La falta de preferencia por residuos individuales en las posiciones P1-P3 es particularmente relevante en lo que respecta a los efectos de ERAP1 sobre el peptidoma de A\*29:02.

#### ***R.6.2 Afinidad de los ligandos de A\*29:02 y sus precursores, por TAP.***

Se determinó la afinidad a TAP de los ligandos de A\*29:02 y de sus precursores con extensiones N-terminales obtenidos de sus proteínas parentales, mediante el uso de un algoritmo predictivo (Diez-Rivero *et al.*, 2010a). Los ligandos naturales mostraron globalmente mayor afinidad que cualquiera de sus precursores N-terminales ( $p < 0.0001$ ), y estas diferencias se incrementaron de manera dependiente de la longitud de la extensión N-terminal (**Figura R11A**). Aunque este patrón es similar al observado en HLA-B\*27 (García-Medel *et al.*, 2014), las diferencias que existen entre los ligandos naturales y sus precursores son más pequeñas en A\*29:02.



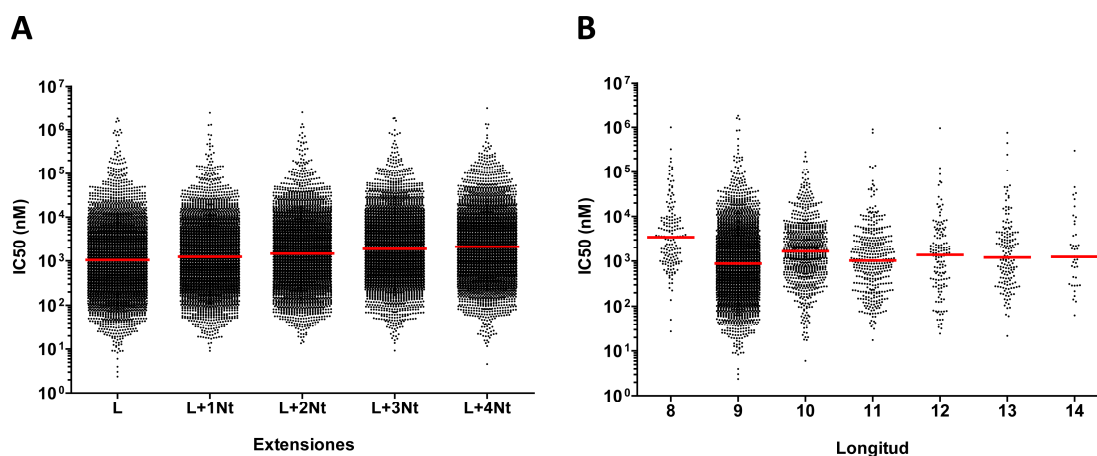
**Figura R9: Características generales del peptidoma de A\*29:02.** Se identificaron un total de 5584 ligandos de A\*29:02 provenientes de tres líneas celulares homocigotas, los cuales fueron analizados de la siguiente manera. **A)** Distribución de longitud. **B)** Distribución de pesos moleculares (MW). En la parte superior de cada barra, y en ambos paneles, se indican la cantidad y el porcentaje de péptidos. **C)** Frecuencia de residuos de los ligandos identificados en las tres posiciones N-terminales (P1-P3) y de las tres posiciones C-terminales (PC-2-PC). La línea punteada indica una FR del 20%. **D)** Los residuos individuales, en las posiciones analizadas anteriormente, fueron agrupados en base a sus características químicas: básicos (R, K, H), ácidos (D, E), alifáticos (A, C, L, I, V, M), polares (N, Q, S, T), aromáticos (F, Y, W) y otros (G, P). FR: Frecuencia Relativa.



**Figura R10: Frecuencia de residuos de los ligandos de A\*29:02 en función de la longitud.** Los 5584 ligandos identificados fueron agrupados de acuerdo a su número de residuos (longitud) y frecuencia de residuos en las tres posiciones N-terminales (P1-P3) y las tres C-terminales (PC-2-PC). La línea punteada muestra una FR de 20% en todas las gráficas.



Asimismo se analizó la afinidad de los ligandos naturales de A\*29:02 en función de su longitud, lo cual mostró que los nonámeros presentan la afinidad más alta por TAP ( $p < 0.0001$ ), seguido de los undecámeros. Los octámeros presentaron la menor afinidad, entre todos los ligandos de A\*29:02 (**Figura R11B**).



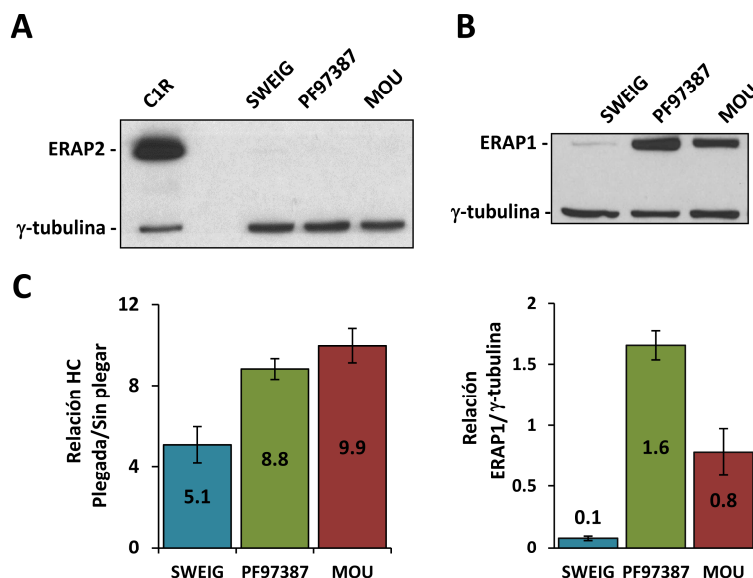
**Figura R11: Afinidad de unión a TAP de los ligandos de HLA-A\*29:02.** A) Afinidad teórica de unión a TAP de los ligandos (L) y sus respectivas extensiones N-terminales (Nt) comprendidas entre 1 a 4 residuos. B) Afinidad teórica de unión a TAP de los ligandos de A\*29:02 en función del número de residuos (longitud). Las líneas rojas indican la mediana obtenida para ese conjunto de valores. Las diferencias estadísticas fueron evaluadas utilizando el test de Mann-Whitney.

### R.6.3 Polimorfismos de ERAP1, ERAP2 y expresión de MHC-I en células HLA-A\*29:02 positivas.

Para analizar la influencia de ERAP1 sobre el peptidoma de A\*29:02, se caracterizaron y cuantificaron los ligandos purificados a partir de tres líneas linfoblastoides A\*29:02<sup>+</sup>. Por Western blot se determinó que ninguna de las líneas celulares expresa ERAP2 (**Figura R12A**), mientras que la expresión de ERAP1 fue variable (**Figura R12B**). PF97387 fue la línea celular que expresó la mayor cantidad de ERAP1, aproximadamente dos veces más que MOU. La línea que expresó menos ERAP1 fue SWEIG, siendo sus niveles de expresión cercanos al 6% y 12.5% relativos a PF97387 y MOU, respectivamente (**Figura R12B**).

Estas diferencias en la expresión de ERAP1 se correlacionaron con un aumento significativo en la cantidad de A\*29:02 sin plegar presente en la superficie celular de SWEIG, en comparación a las otras líneas celulares. Esto se determinó utilizando la relación de proteína plegada/sin plegar, mediante citometría de flujo (**Figura R12C**). En SWEIG, la cantidad de cadena pesada libre de A\*29:02 fue cercana al 23% del total expresado en la superficie, lo cual es cercano al doble de lo encontrado en las otras líneas celulares: 10.1% y 11.7%, para MOU y PF97387, respectivamente. Estos resultados

concuerdan con los encontrados para otros antígenos de MHC-I en sistemas celulares carentes de ERAP1 (Hammer *et al.*, 2006; Haroon *et al.*, 2012).



**Figura R12: Expresión de ERAP1 y ERAP2 en las líneas celulares.** La expresión de ERAP2 **A)** y de ERAP1 **B)** fue evaluada por Western blot utilizando los anticuerpos monoclonales 3F5 y 6H9, respectivamente. El anticuerpo monoclonal GTU-88, específico contra  $\gamma$ -tubulina, se utilizó como control de carga en ambos casos. Se muestra un experimento representativo. La expresión de ERAP1 fue normalizada en función de la relación ERAP1/ $\gamma$ -tubulina para poder comparar los niveles de expresión entre las diferentes líneas celulares (panel inferior). Los datos son los resultados de tres experimentos. **C)** La expresión de HLA-A\*29:02 en la superficie celular fue evaluada utilizando los anticuerpos monoclonales 108-2C5 y HCA2, los cuales reconocen la cadena de HLA-A plegada y sin plegar, respectivamente, con el fin de establecer la relación plegado/sin plegar en cada línea celular. Los datos son la media de 3 experimentos, con su respectiva desviación estándar.

Se utilizó secuenciación genómica para determinar el genotipo de 8 polimorfismos no sinónimos de ERAP1, incluyendo algunos que son relevantes para otras enfermedades inflamatorias asociadas a MHC-I (**Tabla R3**). La variante de ERAP1 en PF97387 difiere de la línea MOU en las posiciones 127 (R127P), 276 (I276I/M), 528 (K528R) y 730 (Q/E730E).

Las diferencias en la expresión de la proteína entre MOU y PF97387, se deben probablemente al polimorfismo de la posición 528, el cual se encuentra en desequilibrio de ligamiento con el SNP rs27434 que conlleva una alteración en la expresión, de manera que 528K se asocia a niveles más altos de proteína (Harvey *et al.*, 2009; Sanz-Bravo *et al.*, 2014). El haplotipo de ERAP1 en SWEIG fue similar al de PF97387, del cual solo difiere en la posición 127 (127P) y por la heterocigosis en la posición 528 (528K/R).

Respecto a la expresión de ERAP2, se han identificado dos SNPs que impiden la expresión de la proteína: rs2248374 y rs10044354 (Andrés *et al.*, 2010; Kuiper *et al.*, 2014). A pesar de que dos líneas son heterocigotas para el SNP rs2248374, las tres líneas

son homocigotas para el polimorfismo rs10044354(C), lo cual explica la ausencia de expresión de ERAP2 en todos los casos (**Tabla R3** y **Figura R12A**).

ERAP1							
SNP	Polimorfismo	PF97387		MOU		SWEIG	
		Base	AA	Base	AA	Base	AA
rs26653	P127R	G	R	C	P	C	P
rs26618	I276M	A	I	A/G	I/M	A	I
rs27895	G346D	G	G	G	G	G	G
rs2287987	M349V	A	M	A	M	A	M
rs30187	K528R	A	K	G	R	A/G	K/R
rs10050860	D575N	G	D	G	D	G	D
rs17482078	R725Q	G	R	G	R	G	R
rs27044	Q730E	C/G	Q/E	G	E	C/G	Q/E
ERAP2							
rs2549782	K392N	G/T	K/N	T	N	G/T	K/N
rs2248374	no-codificante	A/G	-	G	-	A/G	-
rs10044354	no-codificante	C	-	C	-	C	-

**Tabla R3: Variantes de ERAP1 y ERAP2 expresadas en las líneas A\*29:02\*. AA: aminoácido.**

#### **R.6.4 Conservación global del peptidoma de A\*29:02 en distintos contextos de ERAP1.**

Las diferencias en el polimorfismo y expresión de ERAP1, permitieron analizar cuantitativamente los efectos de esta enzima sobre el peptidoma de A\*29:02 mediante comparaciones entre pares de líneas celulares: 1) PF97387/MOU permite analizar los efectos combinados de las posiciones 127/528 y 730. 2) Las comparaciones que involucran a SWEIG permiten analizar el efecto de la ausencia virtual de ERAP1. Aunque MOU es heterocigota en la posición 276, no existe evidencia de que esta posición afecte la función de ERAP1 (Goto *et al.*, 2006).

Los análisis cuantitativos se realizaron mediante secuenciación por triplicado del peptidoma de A\*29:02 de cada línea celular, proveniente del mismo número de células y purificado en idénticas condiciones. Además, la intensidad de cada péptido fue normalizada respecto al total de intensidad obtenido para todos los péptidos secuenciados en el experimento correspondiente. La cantidad de cada péptido está determinada como el valor medio de su intensidad en los tres experimentos. El número de péptidos identificados en cada línea celular y el número de péptidos compartidos en cada comparación se muestra en la **Tabla R4**.

Comparación	Ligandos	Compartidos	% Compartidos	Correlación de Pearson <sup>a</sup>
PF97387/MOU	4931/5075	4583	<b>92.9</b> / 90.3	0.9266
PF97387 / SWEIG	4931 / 3999	3701	75.1 / <b>92.5</b>	0.8710
MOU / SWEIG	5075 / 3999	3747	73.8 / <b>93.7</b>	0.8759

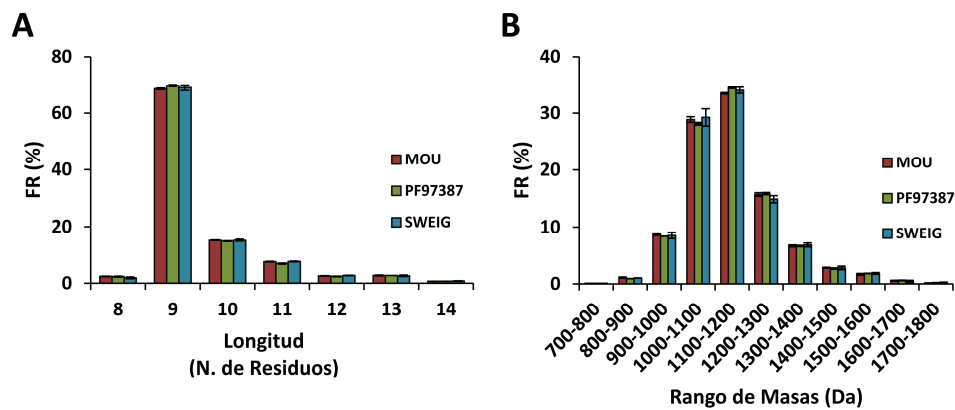
**Tabla R4: Número y porcentaje de ligandos de A\*29:02 entre líneas celulares.** El valor más fiable de péptidos compartidos se considera como aquel obtenido de la línea con menor cantidad de péptidos identificados. Los valores de correlación de Pearson se estimaron sobre las intensidades normalizadas de los péptidos compartidos. <sup>a</sup>Todos los valores de correlación fueron estadísticamente significativos:  $p < 0.0001$ .

Con el fin de establecer si hay diferencias globales en la intensidad de los péptidos compartidos, se analizó cada una de las comparaciones mediante análisis de correlación de Pearson. Estos análisis mostraron que existe un alto grado de conservación en la intensidad de los péptidos entre las diferentes líneas (**Tabla R4**). El hecho de que estos valores sean algo más bajos en las comparaciones que involucran a SWEIG, por lo tanto en casi ausencia de ERAP1, es compatible con que la presencia de la enzima (PF97387/MOU) aumente la linealidad de los niveles de péptidos, lo que implicaría un efecto de ERAP1 sobre el peptidoma de A\*29:02.

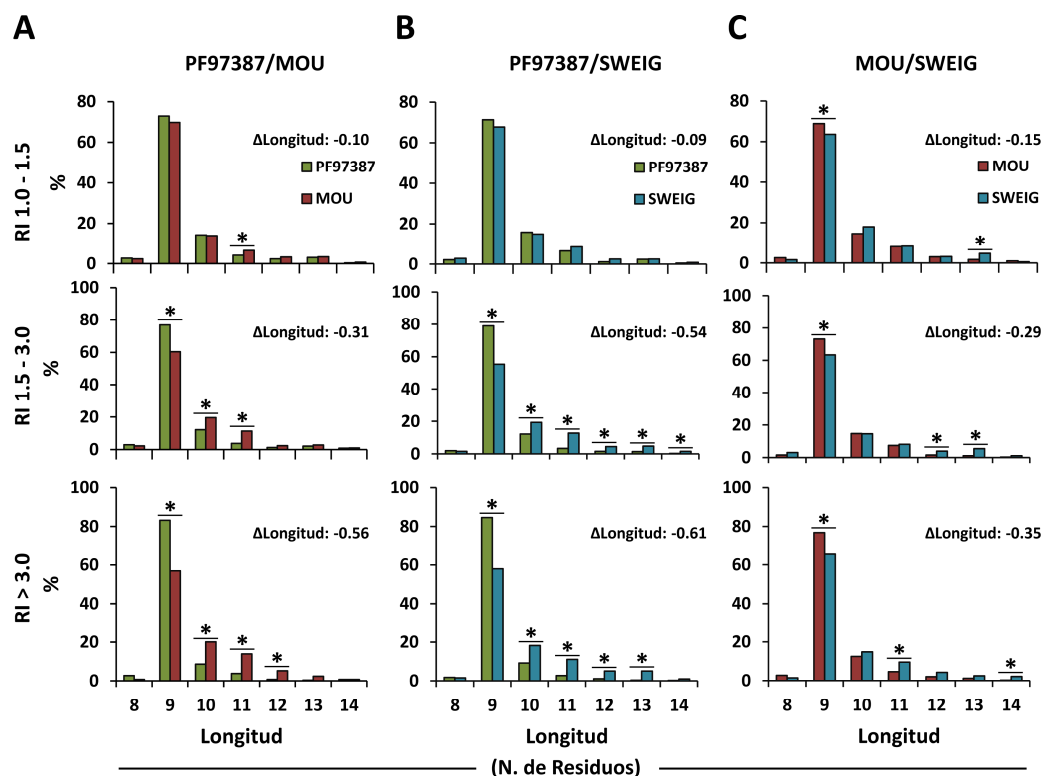
#### ***R.6.5 ERAP1 tiene una influencia significativa en la longitud de los ligandos de A\*29:02.***

La distribución de longitud y peso molecular (MW) de los ligandos de A\*29:02 secuenciados de cada línea celular fueron similares en todos los casos (**Figura R13**). Estos resultados sugieren que el polimorfismo de ERAP1 tiene una influencia global limitada sobre el peptidoma de A\*29:02 o que las comparaciones globales carecen de la resolución necesaria para detectar esta influencia. Con el fin de aumentar el poder de resolución, los péptidos compartidos en las diferentes comparaciones se clasificaron en tres grupos de acuerdo a la relación de intensidad (RI) del péptido en las líneas comparadas: RI >1.0-1.5, >1.5-3.0 y >3.0. Los péptidos pertenecientes a cada subconjunto en una línea celular fueron comparados contra el mismo subconjunto en la otra línea celular, tal como se describió en un trabajo previo de nuestro grupo (García-Medel *et al.*, 2012).

Inicialmente se analizó la distribución de longitudes de los distintos subconjuntos en las siguientes comparaciones: PF97387/MOU, PF97387/SWEIG y MOU/SWEIG. La comparación PF97387/MOU mostró que existe una mayor cantidad de nonámeros en PF97387 respecto a MOU en los subconjuntos de RI >3.0 y >1.5-3.0 (**Figura R14A**). Esto indica que la variante de ERAP1 en PF97387 (127R/528K/730QE) produce ligandos de A\*29:02 más cortos que la variante de MOU (127P/528R/730E).



**Figura R13: Distribución de longitud y peso molecular de los ligandos de A\*29:02 por línea celular.** A) Distribución de longitud de los ligandos de A\*29:02 secuenciados en las líneas celulares indicadas. B) Distribución de peso molecular (MW) de los péptidos analizados en el panel A.



**Figura R14: Distribución de longitud de los ligandos de A\*29:02 en función a su abundancia relativa en distintos contextos de ERAP1.** A) Se identificaron un total de 4583 ligandos compartidos en la comparación PF97387/MOU, los cuales fueron clasificados en los tres subconjuntos indicados en base a la RI del péptido correspondiente. Los péptidos de una longitud determinada fueron comparados con el correspondiente subconjunto de la otra línea celular. Desde arriba hacia abajo, se muestran los péptidos analizados con una RI >1.0-1.5, >1.5-3.0 y >3.0, respectivamente. B) Se identificaron un total de 3701 ligandos compartidos en la comparación PF97387/SWEIG, que se analizaron como en el panel A. C) Se identificaron un total de 3747 ligandos compartidos en la comparación MOU/SWEIG, que se analizaron como en los paneles A y B. En cada panel se muestra la diferencia de longitud media entre los dos subconjuntos comparados ( $\Delta$ Longitud). Las diferencias estadísticas ( $p < 0.05$ ) fueron determinadas por el test de  $\chi^2$  y marcadas con asterisco (\*).

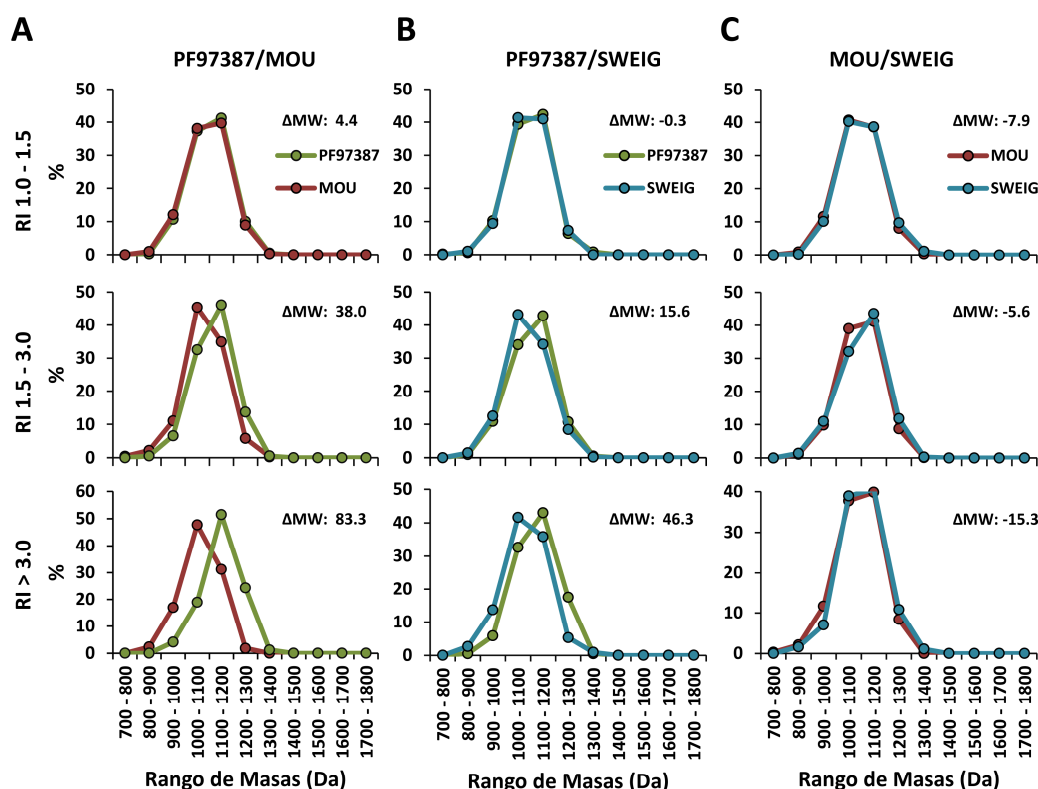
En las comparaciones que involucran a SWEIG, donde se considera la presencia y ausencia de enzima, se observó que, principalmente en los conjuntos de RI >3.0 y >1.5-3.0, los péptidos provenientes de esta línea celular fueron de mayor longitud que los provenientes de las otras líneas, siendo más acusadas las diferencias en PF97387/SWEIG (**Figura R14B**) que en MOU/SWEIG (**Figura R14C**). Estos resultados son consistentes con el papel de ERAP1 en la optimización de la longitud de los ligandos de MHC-I. Además, el hecho de que las diferencias sean menores en MOU/SWEIG, que en PF97387/SWEIG, es consistente con el efecto de la posición 528R en la disminución de la actividad de ERAP1.

#### ***R.6.6 Diferencias independientes de la longitud en la masa molecular de los ligandos de A\*29:02 expresados en distintos contextos de ERAP1.***

Para investigar la posibilidad de que existan diferencias independientes de la longitud en el MW de los ligandos de A\*29:02 en función del contexto de ERAP1, se realizaron dos tipos de análisis. En el primero se analizaron separadamente los nonámeros y decámeros encontrados en las diferentes comparaciones y RI descritas anteriormente (Sección R.6.5). Estos análisis mostraron que en PF97387/MOU existe un desplazamiento de los nonámeros de MOU hacia masas más pequeñas en comparación con PF97387. Estas diferencias se detectaron a partir del subconjunto de RI >1.5 y se incrementaron en RI >3.0 (**Figura R15A**). La comparación PF97387/SWEIG mostró una tendencia análoga (**Figura R15B**). La comparación MOU/SWEIG mostró que existe un desplazamiento muy pequeño de MW hacia masas menores en MOU (**Figura R15C**). Con los decámeros, se obtuvieron resultados similares (**Figura R16**).

En el segundo análisis se utilizaron los nonámeros detectados en una única línea celular. El análisis de distribución de masas de estos péptidos confirmó lo encontrado en el análisis de péptidos compartidos, demostrando que existe una diferencia en la generación de ligandos, que es independiente de la longitud, y es definida por una alteración en las masas de los péptidos presentados. Estas diferencias van de menor a mayor masa, en el siguiente orden: MOU (1073.9 Da), SWEIG (1096.4 Da) y PF97387 (1125.4 Da) (**Figura R17**).

En conjunto, estos resultados indican que, además de alterar la longitud de los péptidos, el polimorfismo y la expresión de ERAP1 modulan la masa molecular de los péptidos siendo mayores las diferencias en un contexto de mayor actividad (PF97387).

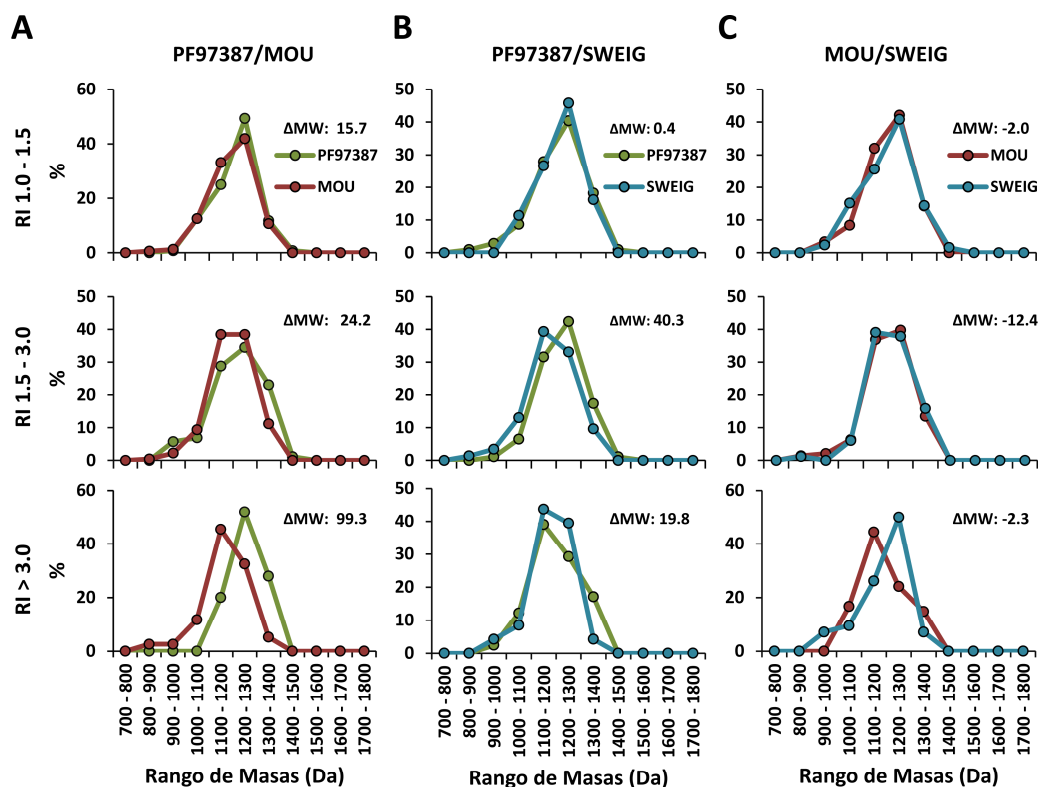


**Figura R15: Diferencias independientes de longitud entre los ligandos de A\*29:02 expresados en distintos contextos de ERAP1.** A) Un total de 3157 noámeros compartidos fueron clasificados y comparados, en base a su distribución de MW, como en la **Figura R13**. B) Un total de 2559 noámeros compartidos en PF97387/SWEIG fueron analizados comparativamente como en el panel A. C) Un total de 2577 noámeros compartidos en MOU/SWEIG fueron comparados como en los paneles A y B. En cada panel se muestra la diferencia de peso molecular medio ( $\Delta MW$ ) entre ambos subconjuntos.

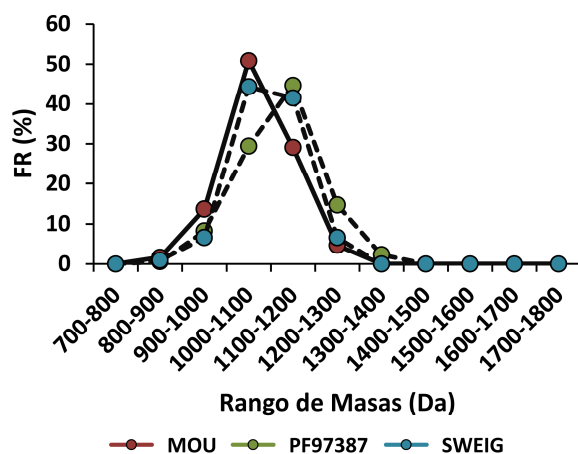
### **R.6.7 Diferencias dependientes de la posición peptídica de los ligandos de A\*29:02 en distintos contextos de ERAP1.**

Las bases moleculares de la influencia independiente de la longitud del polimorfismo de ERAP1 sobre los ligandos de A\*29:02 fue analizada comparando el volumen medio de la cadena lateral de los residuos en los subconjuntos de noámeros con RI >3.0. La comparación PF97387/MOU, mostró que existen diferencias notables de volumen en las posiciones peptídicas, P1-P6 y P8, siendo mayor el volumen en PF97387 (**Figura R18A**). Las diferencias fueron particularmente grandes en P1-P3 y se correlacionaron directamente con el volumen de la cadena lateral y no con cambios en la susceptibilidad a ERAP1 (**Figura R18B y R18C**).





**Figura R16: Diferencias independientes de longitud en los decámeros de A\*29:02 expresados en distintos contextos de ERAP1.** A) Un total de 701 decámeros compartidos fueron clasificados y comparados, en base a su distribución de MW, como en la **Figura R15**. B) Un total de 558 decámeros compartidos en PF97387/SWEIG fueron analizados comparativamente como en el panel A. C) Un total de 563 decámeros compartidos en MOU/SWEIG fueron comparados como en el panel A y B. En cada panel se muestra la diferencia de peso molecular medio ( $\Delta MW$ ) entre ambos subconjuntos.



**Figura R17: Distribución de peso molecular de los noámeros encontrados exclusivamente en una línea celular.** Un total de 170, 234 y 106 noámeros fueron encontrados solamente en PF97387, MOU y SWEIG, respectivamente. Se muestran las distribuciones de MW correspondientes.



El análisis de los nonámeros predominantes en PF97387 y MOU, relativos a SWEIG en las respectivas comparaciones, mostraron que los volúmenes medios de las cadenas laterales de los residuos P1-P8 fueron más altos en PF97387, mientras que las diferencias en la comparación MOU/SWEIG fueron mínimas en la mayoría de las posiciones, excepto en P1, P2 y P7 (**Figura R18D**). Las diferencias en las posiciones P1 y P2 se correlacionaron mejor con el volumen de la cadena lateral de los residuos que con su susceptibilidad al corte por ERAP1, aunque las diferencias fueron más bajas que en la comparación PF97387/MOU (**Figura R18E y R18F**).

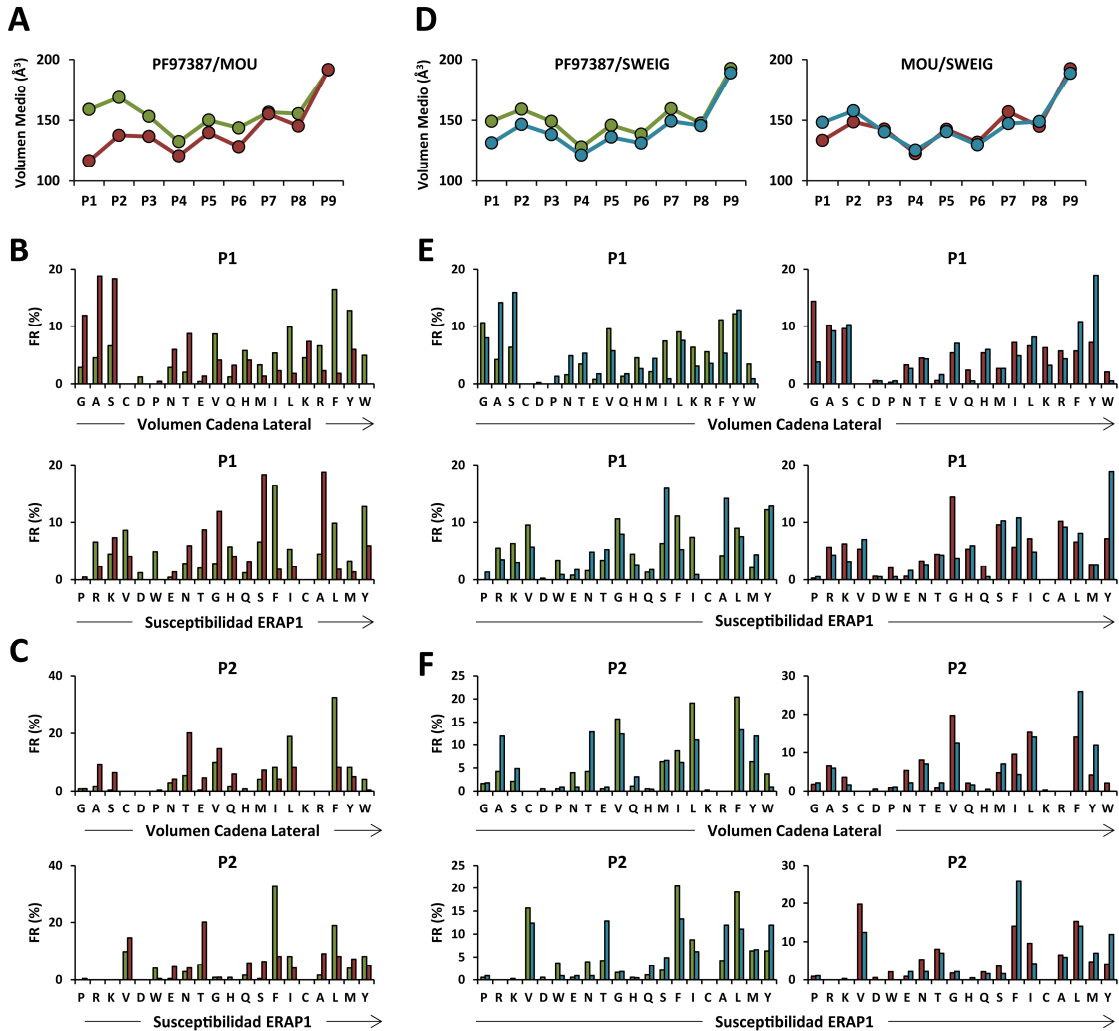
Estos resultados indican que el polimorfismo de ERAP1 configura no solo la longitud sino también la estructura de los ligandos de A\*29:02, influyendo en el volumen de los residuos peptídicos.

#### ***R.6.8 ERAP1 modula la afinidad de los ligandos de A\*29:02 mediante efectos dependientes e independientes de la longitud peptídica.***

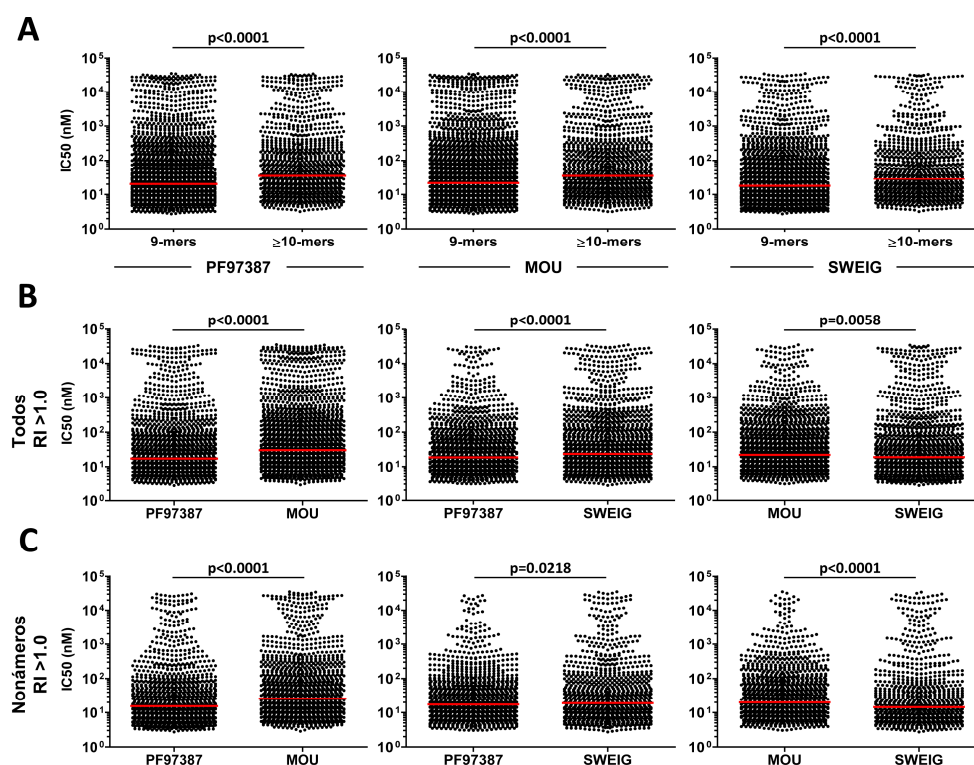
Se examinó la posibilidad de que los efectos de ERAP1 sobre la longitud alteren la afinidad de los ligandos de A\*29:02. Para ello se utilizó un algoritmo predictivo que determina la IC50 específica para HLA-A\*29:02 sobre cada uno de los ligandos (Karosiene *et al.*, 2012).

Los nonámeros mostraron mayor afinidad que los ligandos de mayor longitud en las tres líneas celulares analizadas (**Figura R19A**). Puesto que, los nonámeros constituyen la mayoría de los ligandos en el peptidoma, este resultado indica que los efectos cuantitativos que resultan de la generación de mayor cantidad de nonámeros en presencia de ERAP1 implican una optimización de la afinidad peptídica.

Posteriormente se comparó la afinidad de los ligandos que mostraron expresión diferencial en las comparaciones PF97387/MOU, PF97387/SWEIG y MOU/SWEIG en el subconjunto de RI >1.0. En paralelo, se realizó la misma comparación solo sobre los nonámeros, con el fin de estudiar los efectos independientes de la longitud (**Figura R19B y R19C**). Estos análisis mostraron que PF97387 presentó mayor afinidad que MOU o SWEIG. Este efecto también se mantuvo cuando solo se consideraron nonámeros, solo que las diferencias encontradas en la comparación con SWEIG fueron más sutiles que las encontradas con MOU. En cambio, en la comparación MOU/SWEIG, los péptidos predominantes en MOU tenían menor afinidad que los de SWEIG, lo cual fue aún más evidente cuando se analizaron solo los nonámeros, donde el efecto dependiente de la longitud fue eliminado.



**Figura R18: Efectos de ERAP1 sobre las posiciones de los ligandos de A\*29:02.** Para identificar los efectos de ERAP1, independientes de longitud, sobre la secuencia de los péptidos, se analizaron los nonúmeros de RI >3.0 en las comparaciones indicadas (PF97387, MOU y SWEIG en verde, rojo y azul, respectivamente). **A)** El volumen medio de la cadena lateral se calculó utilizando la frecuencia relativa (FR) de cada residuo en cada posición y el volumen experimental de la cadena lateral de cada aminoácido. **B)** Los valores de FR en P1 fueron ordenados en función del volumen de la cadena lateral (panel superior) o susceptibilidad a ERAP1 (panel inferior). **C)** Los valores de FR en P2 fueron ordenados y comparados como en el panel **B**. **D)** El volumen medio de la cadena lateral en PF97387/SWEIG y MOU/SWEIG se calculó como en el panel **A**. **E)** Los valores de FR en P1 fueron ordenados de acuerdo a lo establecido en el panel **B**. **F)** Distribución de la FR en P2. Los valores fueron ordenados como en el panel **E**.



**Figura R19: Influencia de ERAP1, de manera dependiente e independiente de la longitud, sobre la afinidad de los ligandos de A\*29:02.** **A)** Afinidad de unión predicha para los nonúmeros y péptidos mayores ( $\geq 10$  residuos) obtenidos de cada línea celular. Las líneas rojas indican la mediana de los valores correspondientes. **B)** Afinidad de unión predicha para los ligandos predominantes ( $RI > 1.0$ ) en las comparaciones indicadas. **C)** Los efectos de ERAP1, independientes de la longitud, sobre la afinidad de los ligandos de A\*29:02 se analizó en los nonúmeros predominantes ( $RI > 1.0$ ) de cada comparación. En todas las comparaciones se muestra el valor  $p$  determinado utilizando el test de Mann-Whitney.

Estos resultados indican que en el contexto de una variante de ERAP1 más activa (PF97387), se producen ligandos con mayor afinidad por HLA-A\*29:02. Esta optimización en la afinidad es dependiente de la influencia en la longitud y en la secuencia peptídica. Además, la presencia de una enzima con baja actividad (MOU), no conlleva una optimización del repertorio peptídico de A\*29:02, en términos de afinidad, en relación a una baja o nula expresión de ERAP1 (SWEIG).

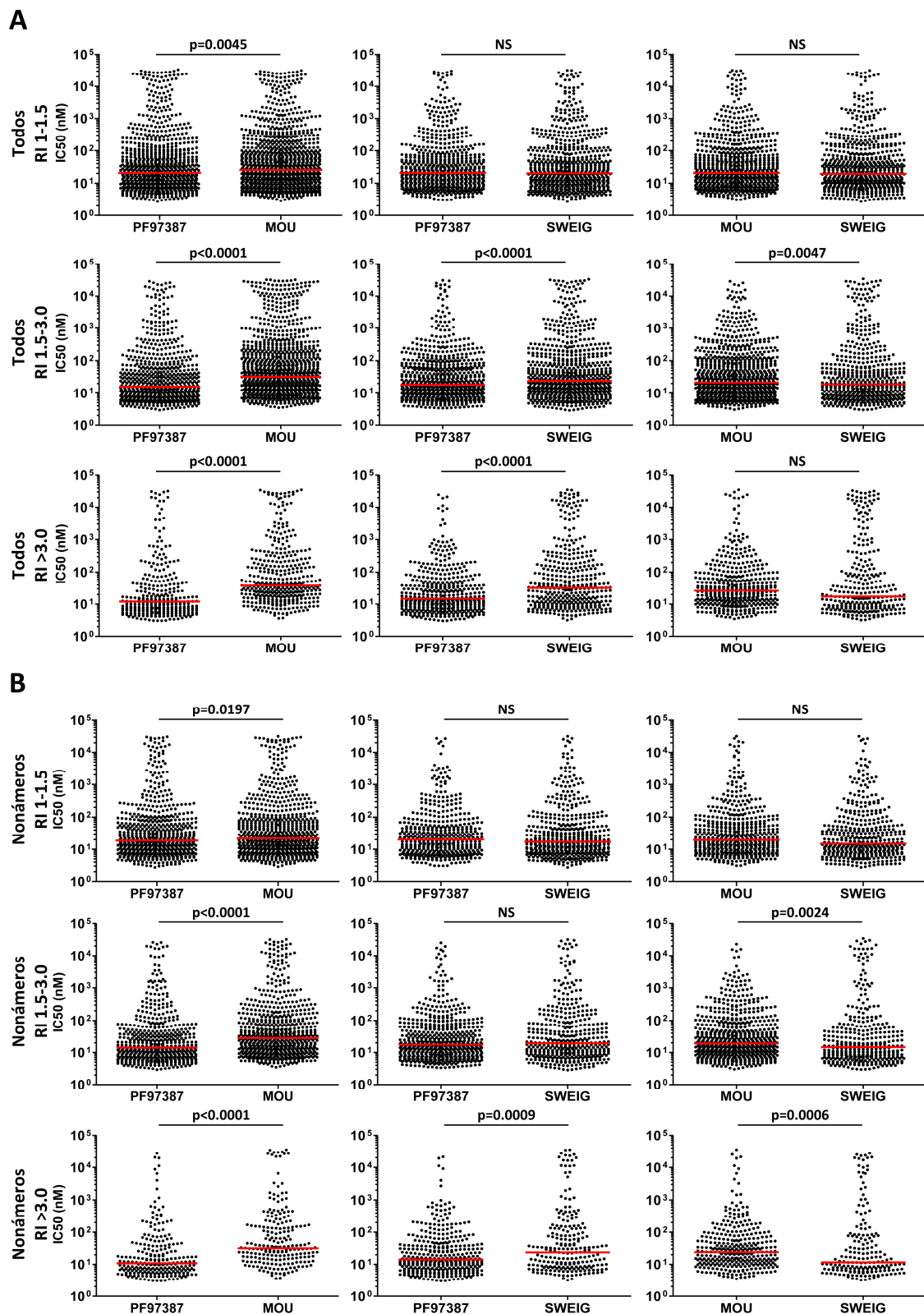
Puesto que los efectos de ERAP1 se manifiestan particularmente al comparar subconjuntos de péptidos con la máxima expresión diferencial, se analizaron comparativamente las afinidades sobre los subconjuntos de péptidos con  $RI > 1.0-1.5$ ,  $> 1.5-3.0$  y  $> 3.0$  (**Figura R20A y R20B**). En la comparación PF97387/MOU, los ligandos que presentaron la mayor afinidad en todos los subconjuntos de  $RI$  fueron los provenientes de PF97387, tanto en los péptidos de todas las longitudes como cuando solo se consideraron nonúmeros. Se observó la misma tendencia cuando se comparó PF97387/SWEIG, solo que las diferencias estadísticas se encontraron en los subconjuntos más extremos:  $RI > 1.5-3.0$  y  $> 3.0$  para todo el conjunto de péptidos y  $RI > 3.0$  cuando solo se consideraron los nonúmeros. La comparación MOU/SWEIG mostró una menor afinidad de los ligandos de MOU, en los subconjuntos de  $RI > 1.5-3.0$  y  $> 3.0$ , cuando se consideraron

los nonámeros. Sin embargo, esta diferencia fue marginal cuando se consideraron todas las longitudes peptídicas. Este resultado sugiere que, aunque el polimorfismo de ERAP1 en MOU tiende a optimizar la longitud de los ligandos de A\*29:02, relativo a la ausencia de ERAP1, existe una modulación independiente de longitud que hace que disminuya la afinidad de los péptidos por A\*29:02.

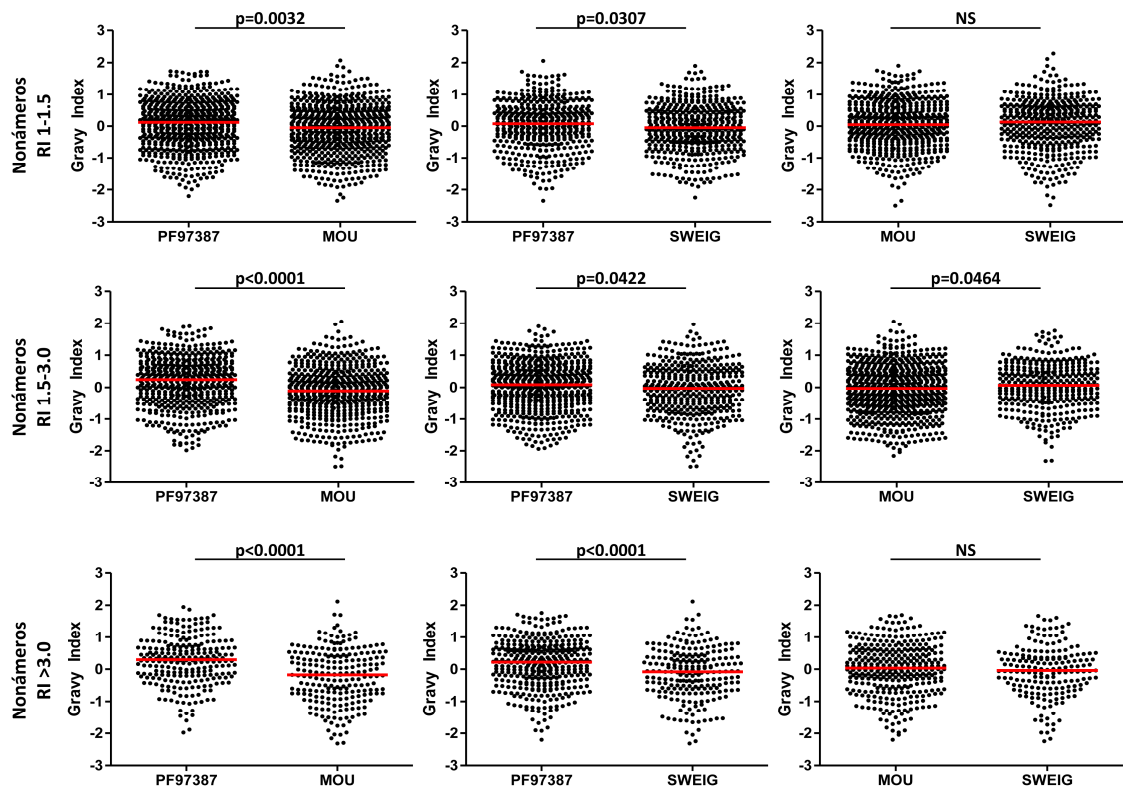
#### ***R.6.9 ERAP1 modula la hidrofobicidad de los ligandos de A\*29:02.***

Hemos demostrado que existe una modulación del repertorio peptídico por ERAP1 en términos de longitud y volumen de los péptidos. Ambas características llevaron a una acción diferencial sobre la afinidad de los complejos péptido/A\*29:02. Con el objetivo de determinar qué característica de los péptidos modula la afinidad, procedimos a analizar los ligandos en función de su hidrofobicidad (Kyte y Doolittle, 1982). Para ello, se calculó el índice de hidropatía para cada uno de los ligandos encontrados en los diferentes subconjuntos de nonámeros utilizados en el análisis de volumen de la **Figura R18**. En la comparación PF97387/MOU, PF97387 mostró una mayor hidrofobicidad. En la comparación PF97387/SWEIG observamos que un incremento en la RI se correlacionó directamente con un aumento en la hidrofobicidad de los péptidos producidos en PF97387. Finalmente, la comparación MOU/SWEIG solo mostró leves diferencias en la RI >1.5-3.0 (**Figura R21**).

Por lo tanto, las diferencias en la hidrofobicidad se corresponden estrictamente con el efecto de ERAP1 sobre el volumen de los residuos peptídicos. Estos resultados indican que el efecto de esta enzima, independiente de la longitud, sobre los ligandos de A\*29:02 consiste en una influencia en el volumen e hidrofobicidad de las cadenas laterales peptídicas, que resulta en una optimización de la afinidad en el contexto de las variantes más activas de la enzima.



**Figura R20: ERAP1 modula la afinidad los ligandos de A\*29:02 de manera independiente de longitud. A)** Los péptidos de todas las longitudes obtenidos en los subconjuntos de RI  $>1-1.5$ ,  $>1.5-3$  y  $>3.0$  fueron comparados en base a su afinidad teórica por A\*29:02. **B)** Comparación de las afinidades de los nonámeros obtenidos en los mismos subconjuntos de RI analizados en el panel A. En todas las comparaciones se muestra el valor  $p$  determinado utilizando el test de Mann-Whitney. NS: no significativo.



**Figura R21: La afinidad de los ligandos de A\*29:02 se correlaciona con su hidrofobicidad.** Se compararon los valores de GRAVY en los nonámeros pertenecientes a los subconjuntos de RI >1-1.5, >1.5-3 y >3.0. Las líneas rojas muestran la mediana entre los valores correspondientes. En todas las comparaciones se muestra el valor  $p$  determinado utilizando el test de Mann-Whitney. NS: no significativo.

## **DISCUSIÓN**





## DISCUSIÓN I.

### **D.1 Ligandos de HLA-B\*27 derivados de *C. trachomatis* y el papel del mimetismo molecular en la ReA.**

El objetivo principal de este apartado fue la identificación directa de ligandos procesados y presentados por HLA-B\*27, que son reconocidos por CTLs de pacientes con ReA y que podrían ser relevantes para la enfermedad. Idealmente esta búsqueda debería haber sido realizada utilizando células infectadas con *C. trachomatis*. Sin embargo, esa aproximación es difícilmente factible debido a los mecanismos de esta bacteria para evadir el sistema inmune. Por ejemplo, *Chlamydia* disminuye la expresión de los antígenos de MHC-I en la superficie celular mediante degradación del factor de transcripción RFX5, que regula su expresión, e induce apoptosis (Fan *et al.*, 1998; Zhong *et al.*, 2000; Belland *et al.*, 2001; Stenner-Liewen *et al.*, 2002; Schwarzenbacher *et al.*, 2004). Por ello, nuestra aproximación fue la identificación directa de ligandos provenientes de proteínas de fusión bacterianas.

Existen diversos mecanismos que apoyan nuestra estrategia de expresión y procesamiento de las proteínas de fusión en el citosol. Por ejemplo, *Chlamydia* es capaz de inyectar proteínas directamente al citosol de la célula infectada mediante el sistema de secreción de tipo III (Fields *et al.*, 2003; Starnbach *et al.*, 2003; Fields *et al.*, 2005; Chellas-Géry *et al.*, 2007). Otro mecanismo que implica degradación citosólica es la cross-presentación de antígeno tras a la captación de restos celulares provenientes de la apoptosis de las células infectadas. La metodología empleada en nuestro estudio imitaría, al menos en parte, los procesos que implican este tipo de degradación, haciendo que las proteínas de *Chlamydia* sigan una vía similar a la descrita para proteínas endógenas (Amigorena y Savina, 2010; Joffre *et al.*, 2012). A pesar de esto, no podemos descartar que durante una infección real, algunas proteínas sean procesadas por métodos alternativos, ya sea por una vía independiente del proteasoma, donde la proteína bacteriana puede provenir de la fusión de las vesículas de inclusión directamente con el RE (Giles y Wyrick, 2008) o a través de otras vías de cross-presentación no citosólicas.

Un argumento que apoya la adecuación de nuestra aproximación experimental es que con ella se demostró el procesamiento y presentación endógenos de varios epítomos bacterianos reconocidos *in vitro*, utilizando péptidos sintéticos, por células T CD8<sup>+</sup> de pacientes con ReA (Kuon *et al.*, 2001).

Estudios previos realizados en nuestro laboratorio, identificaron diversos epítomos derivados de *Chlamydia* usando la tecnología de MALDI-TOF. A pesar de ello, las limitaciones impuestas por este tipo de espectrometría de masas nos llevaron a utilizar técnicas de mayor resolución y sensibilidad basada en electrospray (ESI), así como

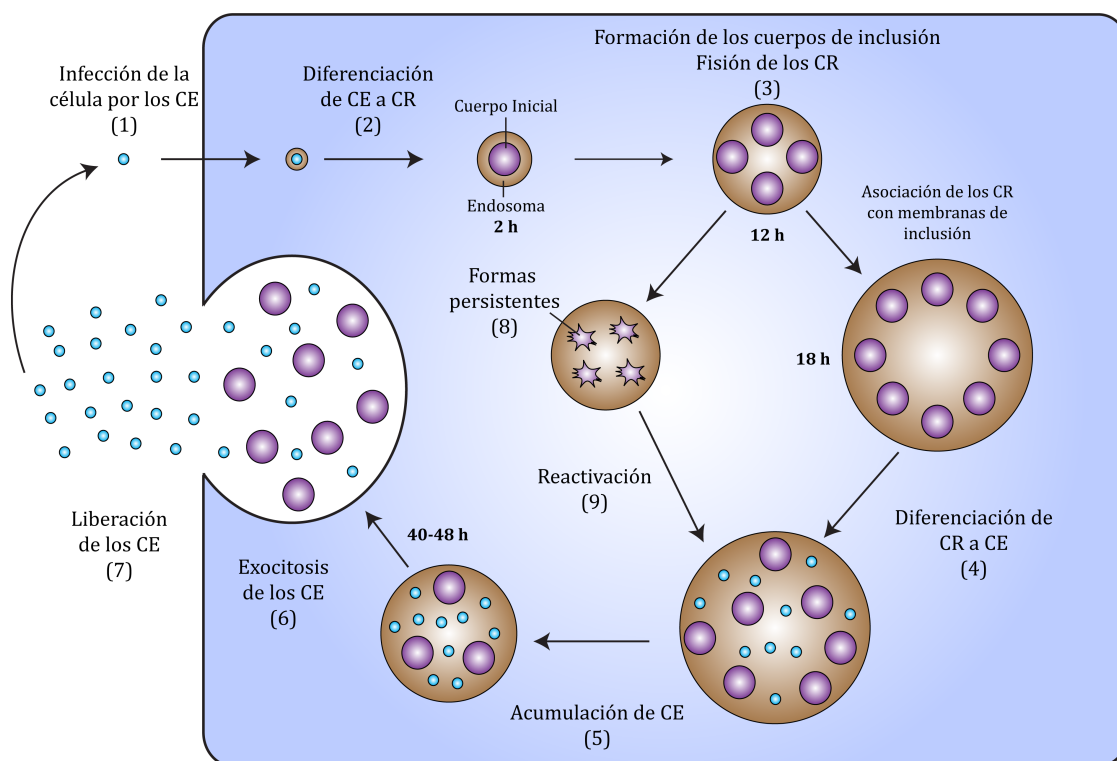
búsquedas focalizadas de epítomos candidatos. Estos cambios nos permitieron detectar epítomos que no fueron encontrados en estudios previos (Cragnolini y López de Castro, 2008; Cragnolini *et al.*, 2009). Es posible que en una infección se generen epítomos en cantidades muy bajas, detectables por CTLs, pero difícilmente por MS. Sin embargo, las proteínas de fusión tienden a tener un alto nivel de expresión y por lo tanto, generarían más copias de los péptidos de *Chlamydia*, compensando en parte la menor sensibilidad de los métodos empleados.

#### **D.1.1 Implicaciones del ciclo de vida de *Chlamydia* para la presentación de antígenos.**

Nuestros estudios han identificado epítomos provenientes de tres proteínas de *Chlamydia trachomatis*: ClpC, NQRA y DNAP. Estudios del perfil transcripcional y caracterización bioquímica del ciclo de vida de *Chlamydia* (**Figura D1**) (Brunham y Rey-Ladino, 2005) indican que ClpC se expresa durante la etapa infectiva en los cuerpos elementales, y a un nivel mucho más alto, en la etapa no infectiva, en los cuerpos reticulares y además se induce en presencia de IFN- $\gamma$  (Belland *et al.*, 2003; Saka *et al.*, 2011). La presencia de la proteína en ambos estadios de desarrollo y su sobre-expresión en un contexto inflamatorio, sugieren que epítomos derivados de ClpC podrían ser importantes tanto en el control de la infección como en el desarrollo de la ReA. La proteína NQRA solo se ha detectado en los cuerpos elementales, lo cual sugiere que puede ser importante durante los primeros estadios de la infección. En cambio, las formas persistentes de *C. trachomatis* mantienen activa la replicación del DNA, lo cual sugiere que esta enzima se está sintetizando activamente y puede ser una fuente de antígenos bacterianos en la enfermedad crónica (Gérard *et al.*, 2001).

#### **D.1.2 Mimetismo molecular.**

Los péptidos derivados de la DNAP de *Chlamydia* son particularmente interesantes como posibles péptidos artritogénicos. Los dos ligandos derivados de esta proteína, DNAP(211-221) y DNAP(211-223), muestran una alta homología con un péptido endógeno que proviene de la porción citoplasmática de la cadena de HLA-B\*27: B27(309-320) (Ramos *et al.*, 2002). El procesamiento endógeno y presentación de DNAP(211-221) fue demostrado en un estudio previo (Cragnolini y López de Castro, 2008). En esta tesis, se identificó una extensión C-terminal de este péptido, DNAP(211-223), lo cual incrementa las posibilidades de mimetismo antigénico entre esta región de la proteína bacteriana y B27(309-320).



**Figura D1: Ciclo de desarrollo de *Chlamydia*.** *Chlamydia trachomatis* es un patógeno intracelular obligado que reside en una vacuola especializada y posee un ciclo de desarrollo bifásico. 1) Las formas infecciosas metabólicamente inactivas o cuerpos elementales (CE) infectan las células de la mucosa, 2) después de ser endocitados, los CE se transforman en cuerpos reticulares (CR) y se forma una inclusión, 3) dentro de la inclusión, se produce la replicación. Los CE se transforman en formas metabólicamente activas o CR por fisión binaria, 4) los CR se transforman en CE, 5) los CE se acumulan y 6-7) se liberan para infectar otras células, 8) en presencia de inhibidores del crecimiento bacteriano, por ejemplo IFN- $\gamma$ , *Chlamydia* adquiere su forma persistente no replicativa, 9) la cual puede reactivarse generando formas infectivas (Modificado a partir de Brunham y Rey-Ladino, 2005).

Las simulaciones dinámicas indican que los dos péptidos derivados de DNAP adoptan conformaciones distintas al unirse a HLA-B\*27, limitando su flexibilidad y adoptando ciertas conformaciones predominantes. En cambio, B27(309-320) mostró una gran flexibilidad en su unión a HLA-B\*27, lo cual concuerda con datos preliminares obtenidos mediante cristalografía de rayos X, en los cuales la parte central del péptido muestra una densidad electrónica difusa, indicativa de una alta movilidad (B. Loll, B. Uchanska-Ziegler, y A. Ziegler, comunicación personal). La flexibilidad limitada de ambos péptidos de DNAP está determinada por puentes de hidrógeno intrapeptídicos establecidos en las regiones centrales y por interacciones péptido-específicas de las regiones centrales con la molécula de HLA-B\*27. La importancia de la flexibilidad radica en que B27(309-320), sería capaz de adoptar una amplia variedad de conformaciones, aumentando de esta manera el espectro de conformaciones antigénicas que pueden ser reconocidas por TCRs específicos para los péptidos derivados de *Chlamydia*.

La notable similitud entre la conformación predicha para DNAP(211-223) y alguno de los *clusters* mayoritarios de B27(309-320) podría favorecer una reacción cruzada, mediada por células T, entre ambos péptidos. Esta similitud no es solo en la conformación general sino también en la distribución de cargas en la superficie del péptido. Ello sugiere que B27(309-320) podría ser reconocido por TCRs en más de una conformación, tal como ha sido demostrado para otros péptidos (Rückert *et al.*, 2006; Nurzia *et al.*, 2010).

Los ensayos funcionales son de suma importancia para establecer un posible mecanismo de mimetismo molecular entre estos epítomos. Sin embargo, el acceso a pacientes con ReA inducida por *C. trachomatis* es muy limitado debido a su difícil diagnóstico y baja prevalencia (Carter y Hudson, 2010). Por ello (en colaboración con el Dr. Daniel López, Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, Majadahonda) se utilizó un método alternativo que consiste en inmunizar ratones HLA-B\*27+ con DNAP(211-221) o DNAP(211-223) y evaluar la posible reacción cruzada mediada por linfocitos T contra B27(309-320). Estos experimentos mostraron reacción contra DNAP(211-223), pero no con B27(309-320), tras inmunizar ratones con DNAP(211-221). Sin embargo, al utilizar como inmunógeno el péptido DNAP(211-223), se detectó reacción cruzada de los linfocitos T contra DNAP(211-221) y B27(309-320). Esta reacción fue mediada por HLA-B\*27 y no restringida por el haplotipo de H-2 presente en la cepa de ratón estudiada (ver **Anexo II**). A pesar de su carácter preliminar, este estudio constituye la primera demostración de mimetismo antigénico entre un epítomo derivado de una bacteria artritogénica y un epítomo de origen humano, restringidos por HLA-B\*27.

En su conjunto, los resultados de nuestro estudio demuestran el procesamiento antigénico y presentación por HLA-B\*27 de múltiples péptidos derivados de *C. trachomatis* con homología a proteínas humanas, al menos uno de las cuales presenta mimetismo molecular y antigénico con un ligando natural de HLA-B\*27 de origen humano. La **Tabla D1** resume los péptidos provenientes de *C. trachomatis* conocidos que son generados endógenamente y presentados por HLA-B\*27:05.

Estos estudios indican que el mimetismo molecular podría constituir un componente patogénico autoinmune en la ReA inducida por *C. trachomatis*. Aunque no demuestra que este sea, de hecho, el papel patogénico de HLA-B\*27, este mecanismo podría exacerbar el papel pro-inflamatorio de esta molécula, influenciando la severidad de la enfermedad y su evolución a formas crónicas de la misma.

Péptido	Proteína Parental	Residuos	Origen/Referencia	Reconocido por CTLs <sup>a</sup>
KRALLEIVI	NQRA	86–94	(Cagnolini <i>et al.</i> , 2009)	No
MRDHTITLL	NQRA	330–338	Esta tesis	Si
RRINREAERF	DNA primasa	112–121	(Cagnolini y López de Castro, 2008)	NA
RRINREAERFF	DNA primasa	112–122	(Cagnolini y López de Castro, 2008)	NA
RRFKEGGRGGK	DNA primasa	211–221	(Cagnolini y López de Castro, 2008)	NA
RRFKEGGRGGKYI	DNA primasa	211–223	Esta tesis	NA
SRLDPVIGR	ClpC	203–211	Esta tesis	No
ARKLLLDNL	PqqC	70–78	(Cagnolini <i>et al.</i> , 2009)	Si

**Tabla D1: Ligandos de *C. trachomatis* restringidos por HLA-B\*27 procesados y presentados en células vivas a partir de proteínas de fusión.** <sup>a</sup>Mediante ensayos *in vitro* utilizando nonámeros y CTLs de pacientes HLA-B\*27<sup>+</sup> infectados con *C. trachomatis* que desarrollaron ReA. NA: no aplicable.

## DISCUSIÓN II.

### D.2 El peptidoma de A\*29:02, su modulación por ERAP1 y su posible papel patogénico.

#### D.2.1 El peptidoma de A\*29:02.

La característica más importante del peptidoma de A\*29:02 es la ausencia de motivos peptídicos N-terminales, con la excepción de las restricciones, relativamente laxas, en P2. Esta característica tiene dos consecuencias principales. La primera es que confiere a A\*29:02 una elevada promiscuidad en su capacidad de unión de péptidos, que viene casi únicamente limitada por las restricciones impuestas por su motivo C-terminal. La segunda es que dota a A\*29:02 de una gran versatilidad en su interacción funcional con ERAP1. En antígenos de MHC-I con motivos muy restrictivos en P2, como por ejemplo HLA-B\*27, la hidrólisis del residuo P1 por ERAP1 conlleva la destrucción del ligando. En A\*29:02 la digestión de P1 también destruye el ligando, pero, con mucha más frecuencia puede generar uno nuevo con un residuo menos, dentro de los límites de longitud impuestos por las moléculas de MHC-I. Por lo tanto, es posible anticipar que la interacción funcional de A\*29:02 con ERAP1 sería de naturaleza diferente que con HLA-B\*27 y otras moléculas de MHC-I con motivos muy restrictivos en P2.

Nuestros resultados contradicen los estudios iniciales sobre el motivo peptídico de A\*29:02 (Boisgerault *et al.*, 1996), que sugería una preferencia por E en P2. Este error se explica por la insuficiencia de las técnicas de purificación y secuenciación utilizadas entonces, cuando la tecnología actual no estaba disponible, y por el bajo número de secuencias caracterizadas.

### **D.2.2 Efectos de la ausencia de ERAP1 sobre el peptidoma A\*29:02.**

Se ha descrito por diversos grupos que la ausencia o disminución de la cantidad de ERAP1 tiene un efecto drástico sobre el peptidoma presentado por las moléculas de MHC-I en lo que respecta a la longitud, estabilidad y motivos peptídicos (Hammer *et al.*, 2007; Haroon *et al.*, 2012; Chen *et al.*, 2014). Nuestros resultados sugieren que el impacto de la ausencia de ERAP1 sobre A\*29:02 podría ser menos drástico que en otras moléculas de MHC-I. La práctica ausencia de ERAP1 en SWEIG llevó a la generación de péptidos más largos en esta línea, respecto a las otras que sí tenían ERAP1, pero ello solo fue patente al comparar ligandos con grandes diferencias en su nivel de expresión. Además, en nuestro caso, la ausencia de ERAP1 no llevó a una disminución significativa en el rendimiento durante la purificación de MHC-I ni en el nivel de expresión en la superficie. El impacto, algo más limitado, de la ausencia de ERAP1 podría explicarse por el hecho de que la ausencia de motivos peptídicos estrictos en P1 y P2 hace menos indispensable el recorte N-terminal de los péptidos por ERAP1 para generar ligandos de HLA-A\*29:02.

Con todo, el mayor nivel de expresión de HC libre en la superficie de SWEIG, observado también en HLA-B\*27 (Haroon *et al.*, 2012), es compatible con la posibilidad de que en ausencia de ERAP1 algunos ligandos de baja afinidad de A\*29:02 alcancen la superficie celular y se disocien fácilmente. Estos ligandos serían difícilmente detectados por nuestros métodos, puesto que estos se basan en la inmunoprecipitación de los complejos MHC/péptido no disociados.

### **D.2.3 Efectos de la presencia y polimorfismo de ERAP1.**

Nuestros resultados indican que ERAP1 participa de forma significativa en la configuración del repertorio peptídico de A\*29:02. Este alotipo, al igual que en otras moléculas de MHC-I, muestra una optimización de la longitud de los péptidos en presencia de la enzima (Hammer *et al.*, 2006; Hammer *et al.*, 2007; García-Medel *et al.*, 2012; Chen *et al.*, 2014). Esta optimización es dependiente de la actividad enzimática, siendo mayor en la variante más activa, que posee el residuo 528K. El mismo efecto se ha observado en B\*27:04 (García-Medel *et al.*, 2012). Además, nuestros datos indican que existe una modulación diferencial, también dependiente del polimorfismo de ERAP1, sobre el volumen, la afinidad y la naturaleza química de los ligandos de A\*29:02, independiente de la longitud de los mismos. Esta característica no ha sido descrita previamente y nuestros datos son los primeros que muestran este nivel de influencia de ERAP1 sobre el peptidoma de MHC-I.

Por lo tanto, el polimorfismo de ERAP1 configura el peptidoma de A\*29:02 afectando: 1) la longitud de los péptidos, 2) su afinidad, 3) el volumen de los residuos peptídicos y 4) su hidrofobicidad. La magnitud de estos efectos es tal, que ERAP1 no solo podría afectar la presentación de antígenos específicos, sino también alterar otras características biológicas de A\*29:02, tales como el plegamiento y la estabilidad.

#### ***D.2.4 Mecanismo de acción de ERAP1 en la configuración del repertorio peptídico, independiente de la longitud.***

Las bases moleculares de la influencia de ERAP1 sobre el volumen de los residuos peptídicos de los ligandos de A\*29:02, radica presumiblemente en la acción de los polimorfismos K528R y Q730E, localizados en la región interdominio II-III y en el sitio de unión a sustrato, respectivamente (**Figura I5**).

El polimorfismo R528K, modula drásticamente la velocidad de reacción de la enzima, quizás debido a la diferencia de volumen entre ambos residuos (168.6 y 173.4 Å<sup>3</sup> para K y R, respectivamente) y a su influencia en la transición conformacional asociada con la adquisición de la actividad enzimática (**Figura I5**). Respecto a la posición 730, puesto que Q (143.8 Å<sup>3</sup>) es más voluminoso que E (138.4 Å<sup>3</sup>), este polimorfismo permitiría unir péptidos de menor y mayor volumen, respectivamente. Por lo tanto, PF97387 presenta una cavidad de menor volumen lo que le permite unir mejor sustratos con residuos menos voluminosos. La presencia de 528K en esta variante favorece a su vez la transición catalítica de la enzima permitiendo una degradación eficiente de dichos sustratos y dejando disponibles para la unión al MHC-I aquellos péptidos voluminosos que no pueden ser degradados tan eficientemente. MOU presenta una cavidad de mayor volumen, lo que le permite degradar péptidos de mayor tamaño, sin embargo, la presencia de 528R hace que tenga una menor actividad catalítica, lo que explica las pequeñas diferencias encontradas respecto a la ausencia de ERAP1 (SWEIG).

#### ***D.2.5 ERAP1 y el papel de ERAP2 como factor de riesgo en BSCR.***

Los estudios genéticos indican un papel de ERAP2 como factor de riesgo para BSCR. Estos estudios no demostraron, pero tampoco excluyeron, la participación de ERAP1 en esta enfermedad (Kuiper *et al.*, 2014). Nuestros resultados muestran que esta enzima influencia significativamente el peptidoma de HLA-A\*29:02. En cambio, el papel de ERAP2 sobre los peptidomas de MHC-I está muy poco explorado y no se conoce la contribución de esta enzima en su modulación. Teniendo en cuenta que ERAP1 y ERAP2 actúan de manera concertada en la generación de ligandos (Saveanu *et al.*, 2005;

Evnouchidou *et al.*, 2014), conviene considerar la posible influencia de ERAP2, en el contexto de ERAP1, en la configuración del repertorio peptídico de HLA-A\*29:02.

Existen distintas opciones por las cuales ERAP2 podría participar en la BSCR. Primero, puede existir un auto-antígeno que requiera específicamente ERAP2 para ser generado. Segundo, debido a que la especificidad de ERAP2 es complementaria a la de ERAP1, podría ser necesaria la presencia de ambas enzimas para generar un determinado auto-antígeno, o ERAP2 sería precisa para generarlo únicamente en ciertos contextos, por ejemplo en presencia de variantes de ERAP1 poco activas. Una tercera opción es que ERAP2 module la acción de ERAP1 influyendo en la cinética de inhibición por sustrato característica de esta enzima (Evnouchidou *et al.*, 2011). Así, ERAP1 puede generar octámeros que inhiben la digestión de péptidos más largos (Evnouchidou *et al.*, 2011; Martín-Esteban *et al.*, 2014). Puesto que, al contrario que ERAP1, ERAP2 no sigue la “regla molecular” (Chang *et al.*, 2005), es capaz de degradar los péptidos de menor longitud que pueden inhibir a ERAP1. Finalmente, otra opción es que ERAP2 puede generar péptidos de longitudes muy pequeñas. Estos podrían modular distintas propiedades de A\*29:02 como el plegamiento, exportación e intercambio de péptidos de menor afinidad, como se ha descrito para péptidos pequeños en otras moléculas de MHC-I (Elliott *et al.*, 1991; Elliott *et al.*, 1992; Saini *et al.*, 2013; Hein *et al.*, 2014; Saini *et al.*, 2014).

En conclusión, los resultados de esta tesis muestran un efecto significativo de ERAP1 en la configuración del peptidoma de A\*29:02 y sugieren que, mediante este mecanismo podría influir en la patogenia de BSCR. El papel de ERAP2 en esta enfermedad debería, por tanto considerarse, teniendo en cuenta la influencia de ERAP1 sobre A\*29:02 y la multiplicidad de mecanismos de interacción funcional entre ambas aminopeptidasas.



## DISCUSIÓN GENERAL

### ***Papel de los péptidos en la patogenia de las enfermedades asociadas a MHC-I***

El hecho de que las moléculas del MHC-I estén especializadas en la presentación de antígeno y la asociación de ERAP1 y ERAP2 a múltiples enfermedades asociadas a MHC-I sugieren un papel esencial de los péptidos en la patogenia de dichas enfermedades. Sin embargo, este papel no es obvio. Dado que las moléculas del MHC-I unen constitutivamente un peptidoma complejo y que esta unión es esencial para la adquisición de la conformación nativa y la estabilidad molecular, los péptidos determinan no solo las propiedades inmunológicas sino la biología global de estas moléculas (Marcilla y López de Castro, 2008).

La influencia del peptidoma en las propiedades inmunológicas de MHC-I se ejerce al menos a tres niveles, todos los cuales tienen potencial patogénico: 1) la presentación de un antígeno concreto puede determinar una respuesta inmune específica y, mediante mimetismo molecular u otros mecanismos (p.ej.: presentación de un neoantígeno específico de tejido), puede generar una reacción autoinmune; este mecanismo ha sido explorado en esta tesis mediante el análisis de péptidos de *C. trachomatis*, un agente patogénico en ReA, y de su homología con epítomos humanos, 2) alteraciones en la naturaleza y afinidad de los ligandos de MHC-I, tales como los inducidos por ERAP1 en A\*29:02, pueden alterar el reconocimiento por células NK (Cifaldi *et al.*, 2015), influyendo así en la inmunidad innata; este mecanismo, podría tener importancia en BSCR debido a la implicación de los genes KIR en esta enfermedad (Levinson *et al.*, 2008), 3) alteraciones globales en el peptidoma, tales como las observadas en HLA-B\*27 (García-Medel *et al.*, 2012; Chen *et al.*, 2014; Sanz-Bravo *et al.*, 2014) y descritas en esta tesis para A\*29:02, pueden alterar la capacidad tolerogénica y el potencial autoinmune de las moléculas de MHC-I, que dependen en parte de la presentación de péptidos en el timo.

La influencia del peptidoma en las propiedades generales de la moléculas de MHC-I, independientemente de la presentación de péptidos específicos, se ejerce al menos a dos niveles: 1) influencia sobre el plegamiento y mal plegamiento, puesto que la unión de péptidos de suficiente afinidad es constitutiva y esencial para la molécula de MHC-I; las consecuencias de un plegamiento lento y mal plegamiento en la activación de respuestas de estrés y del eje pro-inflamatorio IL-23/IL-17 han sido extensamente estudiadas en HLA-B\*27 y propuestas como mecanismo patogénico de la AS (DeLay *et al.*, 2009; Colbert *et al.*, 2014; Smith y Colbert, 2014), 2) influencia sobre la estabilidad molecular; el repertorio peptídico, y sus alteraciones por el polimorfismo de ERAP1, modifican la afinidad global del peptidoma, como se demostrado en esta tesis para A\*29:02 y pueden

afectar a la estabilidad global de la molécula, como se observó en HLA-B\*27:04 (García-Medel *et al.*, 2012). Una de las posibles consecuencias de las alteraciones en la afinidad del peptidoma es la disociación de complejos MHC/péptido en la superficie celular. En HLA-B\*27, y quizá en otras moléculas de MHC-I, este proceso de disociación lleva a la expresión de homodímeros de HC en superficie. Dichos homodímeros, en el caso de HLA-B\*27, reaccionan con KIR3DL2 (Kollnberger *et al.*, 2007) y activan un subconjunto de células Th<sub>17</sub> que portan dicho receptor (Bowness *et al.*, 2011), lo que lleva a la secreción de la citoquina pro-inflamatoria IL-17.

Existe una íntima interrelación entre los procesos descritos. Por ejemplo, la activación de una respuesta específica de células T contra un determinado epítipo conlleva la producción de IFN- $\gamma$ , una citoquina que induce un aumento de expresión de MHC-I, ERAP1 y otras proteínas implicadas en procesamiento antigénico, como por ejemplo, subunidades del inmunoproteasoma. Estos efectos se traducen en alteraciones más generales del peptidoma y en una influencia exacerbada sobre otras propiedades moleculares, tales como el plegamiento/malplegamiento y la expresión de formas no canónicas de MHC-I en la superficie celular.

Se dibuja por tanto un escenario complejo en el que los ligandos de MHC-I pueden actuar por mecanismos diversos, aunque interrelacionados, que afectan tanto a la presentación específica de antígeno como a otras propiedades que pueden promover una acción pro-inflamatoria directa de la molécula de MHC-I. Algunos de esos mecanismos han sido explorados en esta tesis en el contexto de dos antígenos MHC-I asociados a enfermedad: el papel de ligandos específicos de HLA-B\*27 y de alteraciones globales del peptidoma en A\*29:02.

## **CONCLUSIONES**



## CONCLUSIONES

1. Se han identificado tres péptidos derivados de proteínas de *C. trachomatis* que son procesados endógenamente y presentados por HLA-B\*27 en células vivas: ClpC(203-211), NQRA(330-338) y DNAP(211-223).
2. NQRA(330-338) es el segundo epítipo conocido de *C. trachomatis*, restringido por HLA-B\*27 y reconocido por células T CD8<sup>+</sup> de pacientes con ReA, cuyos procesamiento y presentación endógenos se ha demostrado a nivel bioquímico.
3. Los tres ligandos identificados de *C. trachomatis* presentan homología con secuencias de proteínas humanas que poseen los motivos de unión de HLA-B\*27 y alta probabilidad de corte por el proteasoma.
4. El péptido DNAP(211-223) es altamente homólogo a un ligando natural de HLA-B27, derivado de su propia molécula, con el que también presenta similitud conformacional y reactividad cruzada a nivel de células T.
5. En su conjunto, el análisis bioquímico de los ligandos endógenos de HLA-B\*27 procedentes de *C. trachomatis* sugieren que el mimetismo antigénico con antígenos propios es altamente probable y podría jugar un papel patogénico en la ReA.
6. Hemos caracterizado el peptidoma de HLA-A\*29:02, un alotipo que se encuentra fuertemente asociado a la BSCR.
7. El polimorfismo de ERAP1 configura el peptidoma de A\*29:02 influenciando la longitud y la secuencia de los ligandos. Las variantes más activas de la enzima generan un mayor porcentaje de nonámeros, que son los péptidos de longitud óptima, y ligandos de cadenas laterales más voluminosas.
8. Los efectos de ERAP1, dependientes e independientes de la longitud, sobre el peptidoma de A\*29:02 conllevan una mayor afinidad y una hidrofobicidad más alta de los ligandos presentados en el contexto de la variante más activa de la enzima.
9. La magnitud del efecto de ERAP1 sobre el peptidoma de A\*29:02 sugiere que ERAP1 podría influir en la susceptibilidad a BSCR mediante su interacción funcional con A\*29:02 y/o modulando la influencia de ERAP2 en esta enfermedad.
10. El procesamiento endógeno de ligandos bacterianos de HLA-B\*27 y la influencia de ERAP1 en el peptidoma de A\*29:02 ilustran dos mecanismos por los que el peptidoma puede influir en la patogenia de las enfermedades inflamatorias asociadas a MHC-I: a

saber, la presentación de antígenos específicos y cambios globales con capacidad de alterar las características moleculares y el papel pro-inflamatorio de la molécula de MHC-I.

## **BIBLIOGRAFÍA**





- Allen, R.L., Raine, T., Haude, A., Trowsdale, J., Wilson, M.J., (2001). Leukocyte receptor complex-encoded immunomodulatory receptors show differing specificity for alternative HLA-B27 structures. *J. Immunol.* **167**, 5543–7.
- Allen, R.L., Trowsdale, J., (2004). Recognition of classical and heavy chain forms of HLA-B27 by leukocyte receptors. *Curr. Mol. Med.* **4**, 59–65.
- Amigorena, S., Savina, A., (2010). Intracellular mechanisms of antigen cross presentation in dendritic cells. *Curr. Opin. Immunol.* **22**, 109–117.
- Andrés, A.M., Dennis, M.Y., Kretzschmar, W.W., Cannons, J.L., Lee-Lin, S.-Q., Hurle, B., Schwartzberg, P.L., Williamson, S.H., Bustamante, C.D., Nielsen, R., Clark, A.G., Green, E.D., (2010). Balancing selection maintains a form of ERAP2 that undergoes nonsense-mediated decay and affects antigen presentation. *PLoS Genet.* **6**, e1001157.
- Antoniou, A.N., Ford, S., Taurog, J.D., Butcher, G.W., Powis, S.J., (2004). Formation of HLA-B27 homodimers and their relationship to assembly kinetics. *J. Biol. Chem.* **279**, 8895–902.
- Baker, N. a, Sept, D., Joseph, S., Holst, M.J., McCammon, J. a, (2001). Electrostatics of nanosystems: application to microtubules and the ribosome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**, 10037–10041.
- Barnstable, C.J., Bodmer, W.F., Brown, G., Galfre, G., Milstein, C., Williams, A.F., Ziegler, A., (1978). Production of monoclonal antibodies to group A erythrocytes, HLA and other human cell surface antigens-new tools for genetic analysis. *Cell* **14**, 9–20.
- Basler, M., Kirk, C.J., Groettrup, M., (2013). The immunoproteasome in antigen processing and other immunological functions. *Curr. Opin. Immunol.* **25**, 74–80.
- Belland, R.J., Scidmore, M. a, Crane, D.D., Hogan, D.M., Whitmire, W., McClarty, G., Caldwell, H.D., (2001). Chlamydia trachomatis cytotoxicity associated with complete and partial cytotoxin genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**, 13984–13989.
- Belland, R.J., Zhong, G., Crane, D.D., Hogan, D., Sturdevant, D., Sharma, J., Beatty, W.L., Caldwell, H.D., (2003). Genomic transcriptional profiling of the developmental cycle of Chlamydia trachomatis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**, 8478–8483.
- Benjamin, R., Parham, P., (1990). Guilt by association: HLA-B27 and ankylosing spondylitis. *Immunol. Today* **11**, 137–142.
- Bird, L., Peh, C.A., Kollnberger, S., Elliott, T., McMichael, A.J., Bowness, P., (2003). Lymphoblastoid cells express HLA-B27 homodimers both intracellularly and at the cell surface following endosomal recycling. *Eur. J. Immunol.* **33**, 748–759.
- Birtley, J.R., Saridakis, E., Stratikos, E., Mavridis, I.M., (2011). Crystal Structure of Human ER Aminopeptidase 2 Reveals Atomic Basis for Distinct Roles in Antigen Processing. *Biochemistry* **51**, 286–295.
- Bjorkman, P.J., Saper, M. a, Samraoui, B., Bennett, W.S., Strominger, J.L., Wiley, D.C., (1987a). The foreign antigen binding site and T cell recognition regions of class I histocompatibility antigens. *Nature* **329**, 512–518.

- Bjorkman, P.J., Saper, M.A., Samraoui, B., Bennett, W.S., Strominger, J.L., Wiley, D.C., (1987b). Structure of the human class I histocompatibility antigen, HLA-A2. *Nature* **329**, 506–512.
- Blanchard, N., Kanaseki, T., Escobar, H., Delebecque, F., Nagarajan, N.A., Reyes-Vargas, E., Crockett, D.K., Raulet, D.H., Delgado, J.C., Shastri, N., (2010). Endoplasmic reticulum aminopeptidase associated with antigen processing defines the composition and structure of MHC class I Peptide repertoire in normal and virus-infected cells. *J. Immunol.* **184**, 3033–3042.
- Boisgerault, F., Khalil, I., Tieng, V., Connan, F., Tabary, T., Cohen, J.H., Choppin, J., Charron, D., Toubert, A., (1996). Definition of the HLA-A29 peptide ligand motif allows prediction of potential T-cell epitopes from the retinal soluble antigen, a candidate autoantigen in birdshot retinopathy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**, 3466–70.
- Bourdetsky, D., Schmelzer, C.E.H., Admon, A., (2014). The nature and extent of contributions by defective ribosome products to the HLA peptidome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **111**, E1591–9.
- Bowness, P., Ridley, A., Shaw, J., Antoni, T., Wong-baeza, I., Fleming, M., McMichael, A., Kollnberger, S., Chan, A.T., Cummings, F., (2011). Th17 cells expressing KIR3DL2+ and responsive to HLA-B27 homodimers are increased in ankylosing spondylitis. *J. Immunol.* **186**, 2672–2680.
- Brewerton, D.A., Caffrey, M., Nicholls, A., Walters, D., Oates, J.K., James, D.C., (1973). Reiter's disease and HL-A 27. *Lancet* **302**, 996–998.
- Brézin, A.P., Monnet, D., Cohen, J.H.M., Levinson, R.D., (2011). HLA-A29 and Birdshot Chorioretinopathy. *Ocul. Immunol. Inflamm.* **19**, 397–400.
- Brunham, R.C., Rey-Ladino, J., (2005). Immunology of Chlamydia infection: implications for a Chlamydia trachomatis vaccine. *Nat. Rev. Immunol.* **5**, 149–161.
- Burton, P.R., Clayton, D.G., Cardon, L.R., Craddock, N., Deloukas, P., Duncanson, A., Kwiatkowski, D.P., McCarthy, M.I., Ouwehand, W.H., Samani, N.J., Todd, J. a, Donnelly, P., Barrett, J.C., Davison, D., Easton, D., Evans, D.M., Leung, H.-T., Marchini, J.L., Morris, A.P., Spencer, C.C. a, Tobin, M.D., Attwood, A.P., Boorman, J.P., Cant, B., Everson, U., Hussey, J.M., Jolley, J.D., Knight, A.S., Koch, K., Meech, E., Nutland, S., Prowse, C. V, Stevens, H.E., Taylor, N.C., Walters, G.R., Walker, N.M., Watkins, N. a, Winzer, T., Jones, R.W., McArdle, W.L., Ring, S.M., Strachan, D.P., Pembrey, M., Breen, G., St Clair, D., Caesar, S., Gordon-Smith, K., Jones, L., Fraser, C., Green, E.K., Grozeva, D., Hamshere, M.L., Holmans, P. a, Jones, I.R., Kirov, G., Moskvina, V., Nikolov, I., O'Donovan, M.C., Owen, M.J., Collier, D. a, Elkin, A., Farmer, A., Williamson, R., McGuffin, P., Young, A.H., Ferrier, I.N., Ball, S.G., Balmforth, A.J., Barrett, J.H., Bishop, T.D., Iles, M.M., Maqbool, A., Yuldasheva, N., Hall, A.S., Braund, P.S., Dixon, R.J., Mangino, M., Stevens, S., Thompson, J.R., Bredin, F., Tremelling, M., Parkes, M., Drummond, H., Lees, C.W., Nimmo, E.R., Satsangi, J., Fisher, S. a, Forbes, A., Lewis, C.M., Onnie, C.M., Prescott, N.J., Sanderson, J., Matthew, C.G., Barbour, J., Mohiuddin, M.K., Todhunter, C.E., Mansfield, J.C., Ahmad, T., Cummings, F.R., Jewell, D.P., Webster, J., Brown, M.J., Lathrop, M.G., Connell, J., Dominiczak, A., Marcano, C. a B., Burke, B., Dobson, R., Gungadoo, J., Lee, K.L., Munroe, P.B., Newhouse, S.J., Onipinla, A., Wallace, C., Xue, M., Caulfield, M., Farrall, M., Barton, A., Bruce, I.N., Donovan, H., Eyre, S., Gilbert, P.D., Hilder, S.L., Hinks, A.M., John, S.L., Potter, C., Silman, A.J., Symmons, D.P.M., Thomson, W., Worthington, J., Dunger, D.B.,

- Widmer, B., Frayling, T.M., Freathy, R.M., Lango, H., Perry, J.R.B., Shields, B.M., Weedon, M.N., Hattersley, A.T., Hitman, G. a, Walker, M., Elliott, K.S., Groves, C.J., Lindgren, C.M., Rayner, N.W., Timpson, N.J., Zeggini, E., Newport, M., Sirugo, G., Lyons, E., Vannberg, F., Hill, A.V.S., Bradbury, L. a, Farrar, C., Pointon, J.J., Wordsworth, P., Brown, M.A., Franklyn, J. a, Heward, J.M., Simmonds, M.J., Gough, S.C.L., Seal, S., Stratton, M.R., Rahman, N., Ban, M., Goris, A., Sawcer, S.J., Compston, A., Conway, D., Jallow, M., Newport, M., Sirugo, G., Rockett, K. a, Bumpstead, S.J., Chaney, A., Downes, K., Ghorri, M.J.R., Gwilliam, R., Hunt, S.E., Inouye, M., Keniry, A., King, E., McGinnis, R., Potter, S., Ravindrarajah, R., Whittaker, P., Widdens, C., Withers, D., Cardin, N.J., Davison, D., Ferreira, T., Pereira-Gale, J., Hallgrimsdóttir, I.B., Howie, B.N., Su, Z., Teo, Y.Y., Vukcevic, D., Bentley, D., Brown, M.A., Compston, A., Farrall, M., Hall, A.S., Hattersley, A.T., Hill, A.V.S., Parkes, M., Pembrey, M., Stratton, M.R., Mitchell, S.L., Newby, P.R., Brand, O.J., Carr-Smith, J., Pearce, S.H.S., McGinnis, R., Keniry, A., Deloukas, P., Reveille, J.D., Zhou, X., Sims, A.-M., Dowling, A., Taylor, J., Doan, T., Davis, J.C., Savage, L., Ward, M.M., Learch, T.L., Weisman, M.H., Brown, M., (2007). Association scan of 14,500 nonsynonymous SNPs in four diseases identifies autoimmunity variants. *Nat. Genet.* **39**, 1329–1337.
- Calvo, V., Rojo, S., López, D., Galocha, B., López de Castro, J.A., (1990). Structure and diversity of HLA-B27-specific T cell epitopes. Analysis with site-directed mutants mimicking HLA-B27 subtype polymorphism. *J. Immunol.* **144**, 4038–4045.
- Carter, J.D., Hudson, A.P., (2010). The evolving story of Chlamydia-induced reactive arthritis. *Curr. Opin. Rheumatol.* **22**, 424–430.
- Cascio, P., (2014). PA28 $\alpha\beta$ : The Enigmatic Magic Ring of the Proteasome? *Biomolecules* **4**, 566–584.
- Case, D.A., Cheatham, T.E., Darden, T., Gohlke, H., Luo, R., Merz, K.M., Onufriev, A., Simmerling, C., Wang, B., Woods, R.J., (2005). The Amber biomolecular simulation programs. *J. Comput. Chem.*
- Chang, S.-C., Momburg, F., Bhutani, N., Goldberg, A.L., (2005). The ER aminopeptidase, ERAP1, trims precursors to lengths of MHC class I peptides by a “molecular ruler” mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 17107–17112.
- Chellas-Géry, B., Linton, C.N., Fields, K.A., (2007). Human GCIP interacts with CT847, a novel Chlamydia trachomatis type III secretion substrate, and is degraded in a tissue-culture infection model. *Cell. Microbiol.* **9**, 2417–2430.
- Chen, L., Fischer, R., Peng, Y., Reeves, E., McHugh, K., Ternette, N., Hanke, T., Dong, T., Elliott, T., Shastri, N., Kollnberger, S., James, E., Kessler, B., Bowness, P., (2014). Critical role of endoplasmic reticulum aminopeptidase 1 in determining the length and sequence of peptides bound and presented by HLA-B27. *Arthritis Rheumatol. (Hoboken, N.J.)* **66**, 284–94.
- Chevet, E., Smirle, J., Cameron, P.H., Thomas, D.Y., Bergeron, J.J.M., (2010). Calnexin phosphorylation: linking cytoplasmic signalling to endoplasmic reticulum lumenal functions. *Semin. Cell Dev. Biol.* **21**, 486–490.
- Choi, C.-B., Kim, T.-H., Jun, J.-B., Lee, H.-S., Shim, S.C., Lee, B., Pope, A., Uddin, M., Rahman, P., Inman, R.D., (2010). ARTS1 polymorphisms are associated with ankylosing spondylitis in Koreans. *Ann. Rheum. Dis.* **69**, 582–4.

- Cifaldi, L., Romania, P., Falco, M., Lorenzi, S., Meazza, R., Petrini, S., Andreani, M., Pende, D., Locatelli, F., Fruci, D., (2015). ERAP1 regulates natural killer cell function by controlling the engagement of inhibitory receptors. *Cancer Res.*
- Colbert, R. a., Tran, T.M., Layh-Schmitt, G., (2014). HLA-B27 misfolding and ankylosing spondylitis. *Mol. Immunol.*
- Colbert, R.A., (2000). HLA-B27 misfolding: a solution to the spondyloarthropathy conundrum? *Mol. Med. Today* **6**, 224–30.
- Colmegna, I., Cuchacovich, R., Espinoza, L.R., (2004). HLA-B27-associated reactive arthritis: pathogenetic and clinical considerations. *Clin. Microbiol. Rev.* **17**, 348–69.
- Conde-Jaldón, M., Montes-Cano, M.A., García-Lozano, J.R., Ortiz-Fernández, L., Ortego-Centeno, N., González-León, R., Espinosa, G., Graña-Gil, G., Sánchez-Bursón, J., González-Gay, M.A., Barnosi-Marín, A.C., Solans, R., Fanlo, P., Carballeira, M.R., Camps, T., Castañeda, S., Martín, J., González-Escribano, M.F., (2014). Epistatic interaction of ERAP1 and HLA-B in Behçet disease: a replication study in the Spanish population. *PLoS One* **9**, e102100.
- Cortes, A., Hadler, J., Pointon, J.P., Robinson, P.C., Karaderi, T., Leo, P., Cremin, K., Pryce, K., Harris, J., Lee, S., Joo, K. Bin, Shim, S.-C., Weisman, M., Ward, M., Zhou, X., Garchon, H.-J., Chiochia, G., Nossent, J., Lie, B. a, Førre, Ø., Tuomilehto, J., Laiho, K., Jiang, L., Liu, Y., Wu, X., Bradbury, L. a, Elewaut, D., Burgos-Vargas, R., Stebbings, S., Appleton, L., Farrah, C., Lau, J., Kenna, T.J., Haroon, N., Ferreira, M. a, Yang, J., Mulero, J., Fernandez-Sueiro, J.L., Gonzalez-Gay, M. a, López-Larrea, C., Deloukas, P., Donnelly, P., Bowness, P., Gafney, K., Gaston, H., Gladman, D.D., Rahman, P., Maksymowych, W.P., Xu, H., Crusius, J.B. a, van der Horst-Bruinsma, I.E., Chou, C.-T., Valle-Oñate, R., Romero-Sánchez, C., Hansen, I.M., Pimentel-Santos, F., Inman, R.D., Videm, V., Martin, J., Breban, M., Reveille, J.D., Evans, D.M., Kim, T.-H., Wordsworth, P., Brown, M.A., Førre, O., (2013). Identification of multiple risk variants for ankylosing spondylitis through high-density genotyping of immune-related loci. *Nat. Genet.* **45**, 730–8.
- Cox, J., Mann, M., (2008). MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized p.p.b.-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification. *Nat. Biotechnol.* **26**, 1367–1372.
- Cox, J., Neuhauser, N., Michalski, A., Scheltema, R.A., Olsen, J. V, Mann, M., (2011). Andromeda: a peptide search engine integrated into the MaxQuant environment. *J. Proteome Res.* **10**, 1794–1805.
- Cragolini, J.J., García-Medel, N., López de Castro, J.A., (2009). Endogenous processing and presentation of T-cell epitopes from *Chlamydia trachomatis* with relevance in HLA-B27-associated reactive arthritis. *Mol. Cell. Proteomics* **8**, 1850–9.
- Cragolini, J.J., López de Castro, J.A., (2008). Identification of endogenously presented peptides from *Chlamydia trachomatis* with high homology to human proteins and to a natural self-ligand of HLA-B27. *Mol. Cell. Proteomics* **7**, 170–80.
- Dangoria, N.S., DeLay, M.L., Kingsbury, D.J., Mear, J.P., Uchanska-Ziegler, B., Ziegler, A., Colbert, R.A., (2002). HLA-B27 misfolding is associated with aberrant intermolecular disulfide bond formation (dimerization) in the endoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* **277**, 23459–23468.

- Darden, T., York, D., Pedersen, L., (1993). Particle mesh Ewald: An  $N \log(N)$  method for Ewald sums in large systems. *J. Chem. Phys.* **98**, 10089.
- DeLay, M.L., Turner, M.J., Klenk, E.I., Smith, J. a., Sowders, D.P., Colbert, R. a., (2009). HLA-B27 misfolding and the unfolded protein response augment interleukin-23 production and are associated with Th17 activation in transgenic rats. *Arthritis Rheum.* **60**, 2633–2643.
- Diez-Rivero, C.M., Chenlo, B., Zuluaga, P., Reche, P.A., (2010a). Quantitative modeling of peptide binding to TAP using support vector machine. *Proteins* **78**, 63–72.
- Diez-Rivero, C.M., Lafuente, E.M., Reche, P. a, (2010b). Computational analysis and modeling of cleavage by the immunoproteasome and the constitutive proteasome. *BMC Bioinformatics* **11**, 479.
- Dolinsky, T.J., Czodrowski, P., Li, H., Nielsen, J.E., Jensen, J.H., Klebe, G., Baker, N. a., (2007). PDB2PQR: Expanding and upgrading automated preparation of biomolecular structures for molecular simulations. *Nucleic Acids Res.* **35**, 522–525.
- Dolinsky, T.J., Nielsen, J.E., McCammon, J.A., Baker, N. a., (2004). PDB2PQR: An automated pipeline for the setup of Poisson-Boltzmann electrostatics calculations. *Nucleic Acids Res.* **32**, 665–667.
- Dong, G., Wearsch, P. a, Peaper, D.R., Cresswell, P., Reinisch, K.M., (2009). Insights into MHC class I peptide loading from the structure of the tapasin-ERp57 thiol oxidoreductase heterodimer. *Immunity* **30**, 21–32.
- Dougan, D.A., Mogk, A., Zeth, K., Turgay, K.K., Bukau, B., (2002). AAA+ proteins and substrate recognition, it all depends on their partner in crime. *FEBS Lett.* **529**, 6–10.
- Elliott, T., Cerundolo, V., Elvin, J., Townsend, A., (1991). Peptide-induced conformational change of the class I heavy chain. *Nature* **351**, 402–6.
- Elliott, T., Cerundolo, V., Townsend, A., (1992). Short peptides assist the folding of free class I heavy chains in solution. *Eur. J. Immunol.* **22**, 3121–5.
- Evans, D.M., Spencer, C.C.A., Pointon, J.J., Su, Z., Harvey, D., Kochan, G., Oppermann, U., Opperman, U., Dilthey, A., Pirinen, M., Stone, M.A., Appleton, L., Moutsianas, L., Moutsianis, L., Leslie, S., Wordsworth, T., Kenna, T.J., Karaderi, T., Thomas, G.P., Ward, M.M., Weisman, M.H., Farrar, C., Bradbury, L.A., Danoy, P., Inman, R.D., Maksymowych, W.P., Gladman, D., Rahman, P., Morgan, A., Marzo-Ortega, H., Bowness, P., Gaffney, K., Gaston, J.S.H., Smith, M., Bruges-Armas, J., Couto, A.-R., Sorrentino, R., Paladini, F., Ferreira, M. a, Xu, H., Liu, Y., Jiang, L., López-Larrea, C., Díaz-Peña, R., López-Vázquez, A., Zayats, T., Band, G., Bellenguez, C., Blackburn, H., Blackwell, J.M., Bramon, E., Bumpstead, S.J., Casas, J.P., Corvin, A., Craddock, N., Deloukas, P., Dronov, S., Duncanson, A., Edkins, S., Freeman, C., Gillman, M., Gray, E., Gwilliam, R., Hammond, N., Hunt, S.E., Jankowski, J., Jayakumar, A., Langford, C., Liddle, J., Markus, H.S., Mathew, C.G., McCann, O.T., McCarthy, M.I., Palmer, C.N. a, Peltonen, L., Plomin, R., Potter, S.C., Rautanen, A., Ravindrarajah, R., Ricketts, M., Samani, N., Sawcer, S.J., Strange, A., Trembath, R.C., Viswanathan, A.C., Waller, M., Weston, P., Whittaker, P., Widaa, S., Wood, N.W., McVean, G., Reveille, J.D., Wordsworth, P., Brown, M.A., Donnelly, P., (2011). Interaction between ERAP1 and HLA-B27 in ankylosing

- spondylitis implicates peptide handling in the mechanism for HLA-B27 in disease susceptibility. *Nat. Genet.* **43**, 761–7.
- Evnouchidou, I., Berardi, M.J., Stratikos, E., (2009). A continuous fluorogenic assay for the measurement of the activity of endoplasmic reticulum aminopeptidase 1: competition kinetics as a tool for enzyme specificity investigation. *Anal. Biochem.* **395**, 33–40.
- Evnouchidou, I., Birtley, J., Seregin, S., Papakyriakou, A., Zervoudi, E., Samiotaki, M., Panayotou, G., Giastas, P., Petrakis, O., Georgiadis, D., Amalfitano, A., Saridakis, E., Mavridis, I.M., Stratikos, E., (2012). A Common Single Nucleotide Polymorphism in Endoplasmic Reticulum Aminopeptidase 2 Induces a Specificity Switch That Leads to Altered Antigen Processing. *J. Immunol.* **189**, 2383–92.
- Evnouchidou, I., Kamal, R.P., Seregin, S.S., Goto, Y., Tsujimoto, M., Hattori, A., Voulgari, P. V, Drosos, A. a, Amalfitano, A., York, I. a, Stratikos, E., (2011). Cutting Edge: Coding single nucleotide polymorphisms of endoplasmic reticulum aminopeptidase 1 can affect antigenic peptide generation in vitro by influencing basic enzymatic properties of the enzyme. *J. Immunol.* **186**, 1909–13.
- Evnouchidou, I., Momburg, F., Papakyriakou, A., Chroni, A., Chang, S.-C., Goldberg, A.L., Stratikos, E., Leondiadis, L., (2008). The internal sequence of the peptide-substrate determines its N-terminus trimming by ERAP1. *PLoS One* **3**, e3658.
- Evnouchidou, I., Weimershaus, M., Saveanu, L., Van Endert, P., (2014). ERAP1-ERAP2 dimerization increases peptide-trimming efficiency. *J. Immunol.* **193**, 901–908.
- Falk, K., Rötzschke, O., (2002). The final cut: how ERAP1 trims MHC ligands to size. *Nat. Immunol.* **3**, 1121–1122.
- Fan, T., Lu, H., Hu, H., Shi, L., McClarty, G.A., Nance, D.M., Greenberg, A.H., Zhong, G., (1998). Inhibition of apoptosis in chlamydia-infected cells: blockade of mitochondrial cytochrome c release and caspase activation. *J. Exp. Med.* **187**, 487–496.
- Fields, K. a., Mead, D.J., Dooley, C. a., Hackstadt, T., (2003). Chlamydia trachomatis type III secretion: evidence for a functional apparatus during early-cycle development. *Mol. Microbiol.* **48**, 671–683.
- Fields, K.A., Fischer, E.R., Mead, D.J., Hackstadt, T., (2005). Analysis of putative Chlamydia trachomatis chaperones Scc2 and Scc3 and their use in the identification of type III secretion substrates. *J. Bacteriol.* **187**, 6466–6478.
- Firat, E., Huai, J., Saveanu, L., Gaedicke, S., Aichele, P., Eichmann, K., Van Endert, P., Niedermann, G., (2007). Analysis of direct and cross-presentation of antigens in TPPII knockout mice. *J. Immunol.* **179**, 8137–8145.
- Fu, H., Liu, C., Flutter, B., Tao, H., Gao, B., (2009). Calreticulin maintains the low threshold of peptide required for efficient antigen presentation. *Mol. Immunol.* **46**, 3198–3206.
- Gao, G.F., Tormo, J., Gerth, U.C., Wyer, J.R., McMichael, A.J., Stuart, D.I., Bell, J.I., Jones, E.Y., Jakobsen, B.K., (1997). Crystal structure of the complex between human CD8alpha(alpha) and HLA-A2. *Nature* **387**, 630–4.

- García-Medel, N., Sanz-bravo, A., Alvarez-Navarro, C., Gómez-Molina, P., Barnea, E., Marcilla, M., Admon, A., López de Castro, J.A., (2014). Peptide Handling by HLA-B27 Subtypes Influences Their Biological Behavior, Association with Ankylosing Spondylitis and Susceptibility to Endoplasmic Reticulum Aminopeptidase 1 (ERAP1). *Mol. Cell. Proteomics* **13**, 3367–80.
- García-Medel, N., Sanz-Bravo, A., Van Nguyen, D., Galocha, B., Gómez-Molina, P., Martín-Esteban, A., Alvarez-Navarro, C., López de Castro, J.A., (2012). Functional Interaction of the Ankylosing Spondylitis-associated Endoplasmic Reticulum Aminopeptidase 1 Polymorphism and HLA-B27 in Vivo. *Mol. Cell. Proteomics* **11**, 1416–1429.
- Garrett, T.P., Saper, M.A., Bjorkman, P.J., Strominger, J.L., Wiley, D.C., (1989). Specificity pockets for the side chains of peptide antigens in HLA-Aw68. *Nature* **342**, 692–6.
- Garstka, M., Fritzsche, S., Lenart, I., Hein, Z., Jankevicius, G., Boyle, L.H., Elliott, T., Trowsdale, J., Antoniou, A.N., Zacharias, M., Springer, S., (2011). Tapasin dependence of major histocompatibility complex class I molecules correlates with their conformational flexibility. *FASEB J.* **25**, 3989–98.
- Geironson, L., Røder, G., Paulsson, K., (2012). Stability of peptide-HLA-I complexes and tapasin folding facilitation--tools to define immunogenic peptides. *FEBS Lett.* **586**, 1336–43.
- Geironson, L., Thuring, C., Harndahl, M., Rasmussen, M., Buus, S., Røder, G., Paulsson, K., (2013). Tapasin facilitation of natural HLA-A and -B allomorphs is strongly influenced by peptide length, depends on stability, and separates closely related allomorphs. *J. Immunol.* **191**, 3939–47.
- Georgiadou, D., Hearn, A., Evnouchidou, I., Chroni, A., Leondiadis, L., York, I. a, Rock, K.L., Stratikos, E., (2010). Placental leucine aminopeptidase efficiently generates mature antigenic peptides in vitro but in patterns distinct from endoplasmic reticulum aminopeptidase 1. *J. Immunol.* **185**, 1584–92.
- Gérard, H.C., Krausse-Opatz, B., Wang, Z., Rudy, D., Rao, J.P., Zeidler, H., Schumacher, H.R., Whittum-Hudson, J.A., Köhler, L., Hudson, A.P., (2001). Expression of Chlamydia trachomatis genes encoding products required for DNA synthesis and cell division during active versus persistent infection. *Mol. Microbiol.* **41**, 731–41.
- Giles, D.K., Wyrick, P.B., (2008). Trafficking of chlamydial antigens to the endoplasmic reticulum of infected epithelial cells. *Microbes Infect.* **10**, 1494–1503.
- Goto, Y., Hattori, A., Ishii, Y., Tsujimoto, M., (2006). Reduced activity of the hypertension-associated Lys528Arg mutant of human adipocyte-derived leucine aminopeptidase (A-LAP)/ER-aminopeptidase-1. *FEBS Lett.* **580**, 1833–1838.
- Groettrup, M., Soza, A., Kuckelkorn, U., Kloetzel, P.M., (1996). Peptide antigen production by the proteasome: complexity provides efficiency. *Immunol. Today* **17**, 429–435.
- Hammer, G.E., Gonzalez, F., Champsaur, M., Cado, D., Shastri, N., (2006). The aminopeptidase ERAAP shapes the peptide repertoire displayed by major histocompatibility complex class I molecules. *Nat. Immunol.* **7**, 103–112.

- Hammer, G.E., Gonzalez, F., James, E., Nolla, H., Shastri, N., (2007). In the absence of aminopeptidase ERAAP, MHC class I molecules present many unstable and highly immunogenic peptides. *Nat. Immunol.* **8**, 101–108.
- Hammer, R.E., Maika, S.D., Richardson, J.A., Tang, J.P., Taurog, J.D., (1990). Spontaneous inflammatory disease in transgenic rats expressing HLA-B27 and human beta 2m: an animal model of HLA-B27-associated human disorders. *Cell* **63**, 1099–112.
- Haroon, N., Tsui, F.W., Uchanska-Ziegler, B., Ziegler, A., Inman, R.D., (2012). Endoplasmic reticulum aminopeptidase 1 (ERAP1) exhibits functionally significant interaction with HLA-B27 and relates to subtype specificity in ankylosing spondylitis. *Ann. Rheum. Dis.* **71**, 589–595.
- Harvey, D., Pointon, J.J., Evans, D.M., Karaderi, T., Farrar, C., Appleton, L.H., Sturrock, R.D., Stone, M. a, Oppermann, U., Brown, M.A., Wordsworth, P., (2009). Investigating the genetic association between ERAP1 and ankylosing spondylitis. *Hum. Mol. Genet.* **18**, 4204–4212.
- Hearn, A., York, I. a, Rock, K.L., (2009). The specificity of trimming of MHC class I-presented peptides in the endoplasmic reticulum. *J. Immunol.* **183**, 5526–36.
- Hein, Z., Uchtenhagen, H., Abualrous, E.T., Saini, S.K., Janßen, L., Hateren, A. Van, Wiek, C., Hanenberg, H., Momburg, F., Achour, A., Elliott, T., Springer, S., Boulanger, D., Van Hateren, A., (2014). Peptide-independent stabilization of MHC class I molecules breaches cellular quality control. *J. Cell Sci.* **127**, 2885–2897.
- Hooper, N.M., (1994). Families of zinc metalloproteases. *FEBS Lett.* **354**, 1–6.
- Hornak, V., Abel, R., Okur, A., Strockbine, B., Roitberg, A., Simmerling, C., (2006). Comparison of multiple amber force fields and development of improved protein backbone parameters. *Proteins Struct. Funct. Genet.* **65**, 712–725.
- Howard, J.C., (1995). Supply and transport of peptides presented by class I MHC molecules. *Curr. Opin. Immunol.* **7**, 69–76.
- Howarth, M., Williams, A., Tolstrup, A.B., Elliott, T., (2004). Tapasin enhances MHC class I peptide presentation according to peptide half-life. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 11737–42.
- Hughes, E.A., Cresswell, P., (1998). The thiol oxidoreductase ERp57 is a component of the MHC class I peptide-loading complex. *Curr. Biol.* **8**, 709–12.
- Hülsmeier, M., Fiorillo, M.T., Bettosini, F., Sorrentino, R., Saenger, W., Ziegler, A., Uchanska-Ziegler, B., (2004). Dual, HLA-B27 subtype-dependent conformation of a self-peptide. *J. Exp. Med.* **199**, 271–281.
- Joffre, O.P., Segura, E., Savina, A., Amigorena, S., (2012). Cross-presentation by dendritic cells. *Nat. Rev. Immunol.* **12**, 557–569.
- Jorgensen, W.L., Chandrasekhar, J., Madura, J.D., Impey, R.W., Klein, M.L., (1983). Comparison of simple potential functions for simulating liquid water. *J. Chem. Phys.*



- Julià, A., Tortosa, R., Hernanz, J.M., Cañete, J.D., Fonseca, E., Ferrándiz, C., Unamuno, P., Puig, L., Fernández-Sueiro, J.L., Sanmartí, R., Rodríguez, J., Gratacós, J., Dauden, E., Sánchez-Carazo, J.L., López-Esteban, J.L., Moreno-Ramírez, D., Queiró, R., Montilla, C., Torre-Alonso, J.C., Pérez-Venegas, J.J., Vanaclocha, F., Herrera, E., Muñoz-Fernández, S., González, C., Roig, D., Erra, A., Acosta, I., Fernández-Nebro, A., Zarco, P., Alonso, A., López-Lasanta, M., García-Montero, A., Gelpí, J.L., Absher, D., Marsal, S., (2012). Risk variants for psoriasis vulgaris in a large case-control collection and association with clinical subphenotypes. *Hum. Mol. Genet.* **21**, 4549–4557.
- Kanaseki, T., Blanchard, N., Hammer, G.E., Gonzalez, F., Shastri, N., (2006). ERAAP synergizes with MHC class I molecules to make the final cut in the antigenic peptide precursors in the endoplasmic reticulum. *Immunity* **25**, 795–806.
- Kanaseki, T., Shastri, N., (2008). Endoplasmic reticulum aminopeptidase associated with antigen processing regulates quality of processed peptides presented by MHC class I molecules. *J. Immunol.* **181**, 6275–6282.
- Karosiene, E., Lundegaard, C., Lund, O., Nielsen, M., (2012). NetMHCcons: A consensus method for the major histocompatibility complex class I predictions. *Immunogenetics* **64**, 177–186.
- Katoh, K., Misawa, K., Kuma, K., Miyata, T., (2002). MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. *Nucleic Acids Res.* **30**, 3059–3066.
- Kessler, J.H., Khan, S., Seifert, U., Le Gall, S., Chow, K.M., Paschen, A., Bres-Vloemans, S.A., de Ru, A., van Montfoort, N., Franken, K.L.M.C., Benckhuijsen, W.E., Brooks, J.M., van Hall, T., Ray, K., Mulder, A., Doxiadis, I.I.N., van Swieten, P.F., Overkleeft, H.S., Prat, A., Tomkinson, B., Neeffjes, J., Kloetzel, P.M., Rodgers, D.W., Hersh, L.B., Drijfhout, J.W., van Veelen, P. a, Ossendorp, F., Melief, C.J.M., (2011). Antigen processing by nardilysin and thimet oligopeptidase generates cytotoxic T cell epitopes. *Nat. Immunol.* **12**, 45–53.
- Khan, M.A., (2002). Update on spondyloarthropathies. *Ann. Intern. Med.* **136**, 896–907.
- Kirino, Y., Bertsias, G., Ishigatsubo, Y., Mizuki, N., Tugal-Tutkun, I., Seyahi, E., Ozyazgan, Y., Sacli, F.S., Erer, B., Inoko, H., Emrence, Z., Cakar, A., Abaci, N., Ustek, D., Satorius, C., Ueda, A., Takeno, M., Kim, Y., Wood, G.M., Ombrello, M.J., Meguro, A., Gül, A., Remmers, E.F., Kastner, D.L., (2013). Genome-wide association analysis identifies new susceptibility loci for Behçet's disease and epistasis between HLA-B\*51 and ERAP1. *Nat. Genet.* **45**, 202–207.
- Klett, J., Núñez-Salgado, A., Dos Santos, H.G., Cortés-Cabrera, Á., Perona, A., Gil-Redondo, R., Abia, D., Gago, F., Morreale, A., (2012). MM-ISMSA: An ultrafast and accurate scoring function for protein-protein docking. *J. Chem. Theory Comput.* **8**, 3395–3408.
- Kloetzel, P.M., Ossendorp, F., (2004). Proteasome and peptidase function in MHC-class-I-mediated antigen presentation. *Curr. Opin. Immunol.* **16**, 76–81.
- Kochan, G., Krojer, T., Harvey, D., Fischer, R., Chen, L., Vollmar, M., von Delft, F., Kavanagh, K.L., Brown, M.A., Bowness, P., Wordsworth, P., Kessler, B.M., Oppermann, U., (2011). Crystal structures of the endoplasmic reticulum aminopeptidase-1 (ERAP1) reveal

- the molecular basis for N-terminal peptide trimming. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**, 7745–7750.
- Kollnberger, S., Bird, L. a., Roddis, M., Hacquard-Bouder, C., Kubagawa, H., Bodmer, H.C., Breban, M., McMichael, A.J., Bowness, P., (2004). HLA-B27 heavy chain homodimers are expressed in HLA-B27 transgenic rodent models of spondyloarthritis and are ligands for paired Ig-like receptors. *J. Immunol.* **173**, 1699–710.
- Kollnberger, S., Bird, L., Sun, M.Y., Retiere, C., Braud, V.M., McMichael, A., Bowness, P., (2002). Cell-surface expression and immune receptor recognition of HLA-B27 homodimers. *Arthritis Rheum.* **46**, 2972–2982.
- Kollnberger, S., Chan, A., Sun, M.-Y., Chen, L.Y., Wright, C., di Gleria, K., McMichael, A., Bowness, P., (2007). Interaction of HLA-B27 homodimers with KIR3DL1 and KIR3DL2, unlike HLA-B27 heterotrimers, is independent of the sequence of bound peptide. *Eur. J. Immunol.* **37**, 1313–1322.
- Koopmann, J.O., Post, M., Neefjes, J., Hämmerling, G.J., Momburg, F., (1996). Translocation of long peptides by transporters associated with antigen processing (TAP). *Eur. J. Immunol.* **26**, 1720–8.
- Kuiper, J., Rothova, A., de Boer, J., Radstake, T., (2015). The immunopathogenesis of birdshot chorioretinopathy; a bird of many feathers. *Prog. Retin. Eye Res.* **44C**, 99–110.
- Kuiper, J.J.W., Van Setten, J., Ripke, S., Van 't Slot, R., Mulder, F., Missotten, T., Baarsma, G.S., Francioli, L.C., Pulit, S.L., De Kovel, C.G.F., Ten Dam-Van Loon, N., Den Hollander, A.I., Veld, P.H. In Het, Hoyng, C.B., Cordero-Coma, M., Martín, J., Llorenç, V., Arya, B., Thomas, D., Bakker, S.C., Ophoff, R. a, Rothova, A., De Bakker, P.I.W., Mutis, T., Koелеman, B.P.C., (2014). A genome-wide association study identifies a functional ERAP2 haplotype associated with birdshot chorioretinopathy. *Hum. Mol. Genet.* **23**, 1–7.
- Kuon, W., Holzhütter, H.G., Appel, H., Grolms, M., Kollnberger, S., Traeder, A., Henklein, P., Weiss, E., Thiel, A., Lauster, R., Bowness, P., Radbruch, A., Kloetzel, P.M., Sieper, J., (2001). Identification of HLA-B27-restricted peptides from the Chlamydia trachomatis proteome with possible relevance to HLA-B27-associated diseases. *J. Immunol.* **167**, 4738–46.
- Kuon, W., Lauster, R., Bottcher, U.T.E., Koroknay, A., Ulbrecht, M., Hartma, M., Grolms, M., Ugrinovic, S., Braun, J., Weiss, E.H., Sieper, J., Böttcher, U., Hartmann, M., (1997). Recognition of chlamydial antigen by HLA-B27-restricted cytotoxic T cells in HLA-B\*2705 transgenic CBA (H-2k) mice. *Arthritis Rheum.* **40**, 945–954.
- Kuon, W., Sieper, J., (2003a). Identification of HLA-B27-restricted peptides in reactive arthritis and other spondyloarthropathies: Computer algorithms and fluorescent activated cell sorting analysis as tools for hunting of HLA-B27-restricted chlamydial and autologous crossreactive pep. *Rheum. Dis. Clin. North Am.* **29**, 595–611.
- Kuon, W., Sieper, J., (2003b). Identification of HLA-B27-restricted peptides in reactive arthritis and other spondyloarthropathies. *Rheum. Dis. Clin. North Am.* **29**, 595–611.

- Kyte, J., Doolittle, R.F., (1982). A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J. Mol. Biol.* **157**, 105–32.
- Lauvau, G., Kakimi, K., Niedermann, G., Ostankovitch, M., Yotnda, P., Firat, H., Chisari, F. V., Van Endert, P., (1999). Human transporters associated with antigen processing (TAPs) select epitope precursor peptides for processing in the endoplasmic reticulum and presentation to T cells. *J. Exp. Med.* **190**, 1227–40.
- Lehner, P.J., Surman, M.J., Cresswell, P., (1998). Soluble tapasin restores MHC class I expression and function in the tapasin-negative cell line .220. *Immunity* **8**, 221–31.
- Levinson, R.D., Du, Z., Luo, L., Monnet, D., Tabary, T., Brezin, a P., Zhao, L., Gjertson, D.W., Holland, G.N., Reed, E.F., Cohen, J.H.M., Rajalingam, R., (2008). Combination of KIR and HLA gene variants augments the risk of developing birdshot chorioretinopathy in HLA-A\*29-positive individuals. *Genes Immun.* **9**, 249–258.
- Lin, Z., Bei, J.-X., Shen, M., Li, Q., Liao, Z., Zhang, Y., Lv, Q., Wei, Q., Low, H.-Q., Guo, Y.-M., Cao, S., Yang, M., Hu, Z., Xu, M., Wang, X., Wei, Y., Li, L., Li, C., Li, T., Huang, J., Pan, Y., Jin, O., Wu, Y., Wu, J., Guo, Z., He, P., Hu, S., Wu, H.H., Song, H., Zhan, F., Liu, S., Gao, G., Liu, Z., Li, Y., Xiao, C., Li, J., Ye, Z., He, W., Liu, D., Shen, L., Huang, A., Tao, Y., Pan, X., Yu, B., Tai, E.S., Zeng, Y.-X., Ren, E.C., Shen, Y., Liu, J., Gu, J., (2012). A genome-wide association study in Han Chinese identifies new susceptibility loci for ankylosing spondylitis. *Nat. Genet.* **44**, 73–77.
- Long, E.O., Rosen-Bronson, S., Karp, D.R., Malnati, M., Sekaly, R.P., Jaraquemada, D., Sekaiy, R.P., (1991). Efficient cDNA expression vectors for stable and transient expression of HLA-DR in transfected fibroblast and lymphoid cells. *Hum. Immunol.* **31**, 229–235.
- Lorente, E., Barriga, A., Johnstone, C., Mir, C., Jiménez, M., López, D., (2013). Concerted In Vitro Trimming of Viral HLA-B27-Restricted Ligands by Human ERAP1 and ERAP2 Aminopeptidases. *PLoS One* **8**, e79596.
- Lozano, F., Santos-Aguado, J., Borche, L., Places, L., Doménech, N., Gayá, A., Vilella, R., Vives, J., (1989). Identification of the amino acid residues defining an intralocus determinant in the alpha 1 domain of HLA-A molecules. *Immunogenetics* **30**, 50–3.
- Madden, D.R., (1995). The three-dimensional structure of peptide-MHC complexes. *Annu. Rev. Immunol.* **13**, 587–622.
- Madden, D.R., Gorga, J.C., Strominger, J.L., Wiley, D.C., (1992). The three-dimensional structure of HLA-B27 at 2.1 Å resolution suggests a general mechanism for tight peptide binding to MHC. *Cell* **70**, 1035–48.
- Madden, D.R., Wiley, D.C., (1992). Peptide binding to the major histocompatibility complex molecules. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2**, 300–304.
- Marcilla, M., López de Castro, J.A., (2008). Peptides: The cornerstone of HLA-B27 biology and pathogenetic role in spondyloarthritis. *Tissue Antigens*.
- Martín-Esteban, A.A., Gómez-Molina, P., Sanz-Bravo, A., López de Castro, J.A., (2014). Combined effects of ankylosing spondylitis-associated ERAP1 polymorphisms outside the catalytic and peptide-binding sites on the processing of natural HLA-B27 ligands. *J. Biol. Chem.* **289**, 3978–3990.

- May, E., Dorris, M.L., Satumtira, N., Iqbal, I., Rehman, M.I., Lightfoot, E., Taurog, J.D., (2003). CD8 alpha beta T cells are not essential to the pathogenesis of arthritis or colitis in HLA-B27 transgenic rats. *J. Immunol.* **170**, 1099–1105.
- Mear, J.P., Schreiber, K.L., Münz, C., Zhu, X., Stevanović, S., Rammensee, H.G., Rowland-Jones, S.L., Colbert, R.A., (1999). Misfolding of HLA-B27 as a result of its B pocket suggests a novel mechanism for its role in susceptibility to spondyloarthropathies. *J. Immunol.* **163**, 6665–70.
- Nguyen, T.T., Chang, S.-C., Evnouchidou, I., York, I. a, Zikos, C., Rock, K.L., Goldberg, A.L., Stratikos, E., Stern, L.J., (2011). Structural basis for antigenic peptide precursor processing by the endoplasmic reticulum aminopeptidase ERAP1. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **18**, 604–613.
- Nurzia, E., Panimolle, F., Cauli, A., Mathieu, A., Magnacca, A., Paladini, F., Sorrentino, R., Fiorillo, M.T., (2010). CD8+ T-cell mediated self-reactivity in HLA-B27 context as a consequence of dual peptide conformation. *Clin. Immunol.* **135**, 476–482.
- Ombrello, M.J., Kirino, Y., de Bakker, P.I.W., Gül, A., Kastner, D.L., Remmers, E.F., (2014). Behçet disease-associated MHC class I residues implicate antigen binding and regulation of cell-mediated cytotoxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **111**, 8867–8872.
- Orr, H.T., López de Castro, J.A., Lancet, D., Strominger, J.L., (1979). Complete amino acid sequence of a papain-solubilized human histocompatibility antigen, HLA-B7. 2. Sequence determination and search for homologies. *Biochemistry* **18**, 5711–20.
- Pamer, E., Cresswell, P., (1998). Mechanisms of MHC class I--restricted antigen processing. *Annu. Rev. Immunol.* **16**, 323–358.
- Phillips, J.C., Braun, R., Wang, W., Gumbart, J., Tajkhorshid, E., Villa, E., Chipot, C., Skeel, R.D., Kalé, L., Schulten, K., (2005). Scalable molecular dynamics with NAMD. *J. Comput. Chem.*
- Pimentel-Santos, F., Matos, M., Ligeiro, D., Mourão, a. F., Ribeiro, C., Costa, J., Santos, H., Barcelos, A., Pinto, P., Cruz, M., Sousa, E., Santos, R. a., Fonseca, J.E., Trindade, H., Guedes-Pinto, H., Branco, J.C., (2013). HLA alleles and HLA-B27 haplotypes associated with susceptibility and severity of ankylosing spondylitis in a Portuguese population. *Tissue Antigens* **82**, 374–379.
- Popov, I., Cruz, C.S. Dela, Barber, B.H., Chiu, B., Inman, R.D., Dela Cruz, C.S., (2002). Breakdown of CTL tolerance to self HLA-B\*2705 induced by exposure to Chlamydia trachomatis. *J. Immunol.* **169**, 4033–4038.
- Popov, I., Dela Cruz, C.S., Barber, B.H., Chiu, B., Inman, R.D., Cruz, C.S. Dela, (2001). The effect of an anti-HLA-B27 immune response on CTL recognition of Chlamydia. *J. Immunol.* **167**, 3375–3382.
- Praveen, P.V.K., Yaneva, R., Kalbacher, H., Springer, S., (2010). Tapasin edits peptides on MHC class I molecules by accelerating peptide exchange. *Eur. J. Immunol.* **40**, 214–24.
- Princiotta, M.F., Finzi, D., Qian, S., Gibbs, J., Schuchmann, S., Buttgereit, F., Bennink, J.R., Yewdell, J.W., (2003). Quantitating protein synthesis, degradation, and endogenous antigen processing. *Immunity* **18**, 343–354.

- Purcell, A.W., Gorman, J.J., García-Peydró, M., Paradela, A., Burrows, S.R., Talbo, G.H., Laham, N., Peh, C.A., Reynolds, E.C., López de Castro, J.A., McCluskey, J., (2001). Quantitative and qualitative influences of tapasin on the class I peptide repertoire. *J. Immunol.* **166**, 1016–27.
- R Development Core Team, (2012). R. Foundation for Statistical Computing, Viena, Austria.
- Ramos, M., Alvarez, I., Sesma, L., Logean, A., Rognan, D., López de Castro, J.A., (2002). Molecular mimicry of an HLA-B27-derived ligand of arthritis-linked subtypes with chlamydial proteins. *J. Biol. Chem.* **277**, 37573–37581.
- Reeves, E., Colebatch-Bourn, A., Elliott, T., Edwards, C.J., James, E., (2014). Functionally distinct ERAP1 allotype combinations distinguish individuals with Ankylosing Spondylitis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **111**, 17594–17599.
- Reeves, E., Edwards, C.J., Elliott, T., James, E., Immunol, J., (2013). Naturally Occurring ERAP1 Haplotypes Encode Functionally Distinct Alleles with Fine Substrate Specificity. *J. Immunol.*
- Reveille, J.D., Sims, A.-M., Danoy, P., Evans, D.M., Leo, P., Pointon, J.J., Jin, R., Zhou, X., Bradbury, L.A., Appleton, L.H., Davis, J.C., Diekman, L., Doan, T., Dowling, A., Duan, R., Duncan, E.L., Farrar, C., Hadler, J., Harvey, D., Karaderi, T., Mogg, R., Pomeroy, E., Pryce, K., Taylor, J., Savage, L., Deloukas, P., Kumanduri, V., Peltonen, L., Ring, S.M., Whittaker, P., Glazov, E., Thomas, G.P., Maksymowych, W.P., Inman, R.D., Ward, M.M., Stone, M.A., Weisman, M.H., Wordsworth, P., Brown, M.A., (2010). Genome-wide association study of ankylosing spondylitis identifies non-MHC susceptibility loci. *Nat. Genet.* **42**, 123–127.
- Roder, G., Geironson, L., Rasmussen, M., Harndahl, M., Buus, S., Paulsson, K., (2011). Tapasin discriminates peptide-human leukocyte antigen-A\*02:01 complexes formed with natural ligands. *J. Biol. Chem.* **286**, 20547–57.
- Rückert, C., Fiorillo, M.T., Loll, B., Moretti, R., Biesiadka, J., Saenger, W., Ziegler, A., Sorrentino, R., Uchanska-Ziegler, B., (2006). Conformational dimorphism of self-peptides and molecular mimicry in a disease-associated HLA-B27 subtype. *J. Biol. Chem.* **281**, 2306–2316.
- Sadasivan, B., Lehner, P.J., Ortmann, B., Spies, T., Cresswell, P., (1996). Roles for calreticulin and a novel glycoprotein, tapasin, in the interaction of MHC class I molecules with TAP. *Immunity* **5**, 103–14.
- Saini, S.K., Ostermeir, K., Ramnarayan, V.R., Schuster, H., Zacharias, M., Springer, S., (2013). Dipeptides promote folding and peptide binding of MHC class I molecules. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **110**, 15383–15388.
- Saini, S.K., Schuster, H., Ramnarayan, V.R., Rammensee, H.G., Stevanović, S., Springer, S., (2014). Dipeptides catalyze rapid peptide exchange on MHC class I molecules. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*
- Saka, H. a, Thompson, J.W., Chen, Y., Kumar, Y., Dubois, L.G., Moseley, M.A., Valdivia, R.H., (2011). Quantitative proteomics reveals metabolic and pathogenic properties of Chlamydia trachomatis developmental forms. *Mol. Microbiol.* 1–19.

- Sanz-Bravo, A., Campos, J., Mazariegos, M.S., López de Castro, J.A., (2014). Dominant role of the ERAP1 polymorphism R528K in shaping the HLA-B27 peptidome through differential processing determined by multiple peptide residues. *Arthritis Rheumatol. (Hoboken, N.J.)* 1–40.
- Saper, M.A., Bjorkman, P.J., Wiley, D.C., (1991). Refined structure of the human histocompatibility antigen HLA-A2 at 2.6 Å resolution. *J. Mol. Biol.* **219**, 277–319.
- Saric, T., Chang, S.-C., Hattori, A., York, I. a, Markant, S., Rock, K.L., Tsujimoto, M., Goldberg, A.L., (2002). An IFN-gamma-induced aminopeptidase in the ER, ERAP1, trims precursors to MHC class I-presented peptides. *Nat. Immunol.* **3**, 1169–1176.
- Saveanu, L., Carroll, O., Lindo, V., Del Val, M., López, D., Lepelletier, Y., Greer, F., Schomburg, L., Fruci, D., Niedermann, G., Van Endert, P., (2005). Concerted peptide trimming by human ERAP1 and ERAP2 aminopeptidase complexes in the endoplasmic reticulum. *Nat. Immunol.* **6**, 689–697.
- Schubert, U., Antón, L.C., Gibbs, J., Norbury, C.C., Yewdell, J.W., Bennink, J.R., (2000). Rapid degradation of a large fraction of newly synthesized proteins by proteasomes. *Nature* **404**, 770–4.
- Schwarzenbacher, R., Stenner-Liewen, F., Liewen, H., Robinson, H., Yuan, H., Bossy-Wetzel, E., Reed, J.C., Liddington, R.C., (2004). Structure of the Chlamydia protein CADD reveals a redox enzyme that modulates host cell apoptosis. *J. Biol. Chem.* **279**, 29320–29324.
- Serwold, T., Gonzalez, F., Kim, J., Jacob, R., Shastri, N., (2002). ERAAP customizes peptides for MHC class I molecules in the endoplasmic reticulum. *Nature* **419**, 480–483.
- Shah, K.H., Levinson, R.D., Yu, F., Goldhardt, R., Gordon, L.K., Gonzales, C.R., Heckenlively, J.R., Kappel, P.J., Holland, G.N., (2005). Birdshot chorioretinopathy. *Surv. Ophthalmol.* **50**, 519–541.
- Smith, J.A., Colbert, R.A., (2014). Review: The interleukin-23/interleukin-17 axis in spondyloarthritis pathogenesis: Th17 and beyond. *Arthritis Rheumatol. (Hoboken, N.J.)* **66**, 231–41.
- Stam, N.J., Vroom, T.M., Peters, P.J., Pastoors, E.B., Ploegh, H.L., (1990). HLA-A- and HLA-B-specific monoclonal antibodies reactive with free heavy chains in western blots, in formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections and in cryo-immuno-electron microscopy. *Int. Immunol.* **2**, 113–125.
- Starnbach, M.N., Loomis, W.P., Ovendale, P., Regan, D., Hess, B., Alderson, M.R., Steven, P., Fling, S.P., (2003). An inclusion membrane protein from Chlamydia trachomatis enters the MHC class I pathway and stimulates a CD8+ T cell response. *J. Immunol.* **171**, 4742–4749.
- Stenner-Liewen, F., Liewen, H., Zapata, J.M., Pawlowski, K., Godzik, A., Reed, J.C., (2002). CADD, a Chlamydia protein that interacts with death receptors. *J. Biol. Chem.* **277**, 9633–9636.

- Storkus, W.J., Howell, D.N., Salter, R.D., Dawson, J.R., Cresswell, P., Jeffrey, R., (1987). NK susceptibility varies inversely with target cell class I HLA antigen expression. *J. Immunol.* **138**, 1657–1659.
- Strange, A., Capon, F., Spencer, C.C. a, Knight, J., Weale, M.E., Allen, M.H., Barton, A., Band, G., Bellenguez, C., Bergboer, J.G.M., Blackwell, J.M., Bramon, E., Bumpstead, S.J., Casas, J.P., Cork, M.J., Corvin, A., Deloukas, P., Dillthey, A., Duncanson, A., Edkins, S., Estivill, X., Fitzgerald, O.M., Freeman, C., Giardina, E., Gray, E., Hofer, A., Hüffmeier, U., Hunt, S.E., Irvine, A.D., Jankowski, J., Kirby, B., Langford, C., Lascorz, J., Leman, J., Leslie, S., Mallbris, L., Markus, H.S., Mathew, C.G., McLean, W.H.I., McManus, R., Mössner, R., Moutsianas, L., Naluai, A.T., Nestle, F.O., Novelli, G., Onoufriadis, A., Palmer, C.N. a, Perricone, C., Pirinen, M., Plomin, R., Potter, S.C., Pujol, R.M., Rautanen, A., Riveira-Munoz, E., Ryan, A.W., Salmhofer, W., Samuelsson, L., Sawcer, S.J., Schalkwijk, J., Smith, C.H., Ståhle, M., Su, Z., Tazi-Ahnini, R., Traupe, H., Viswanathan, A.C., Warren, R.B., Weger, W., Wolk, K., Wood, N., Worthington, J., Young, H.S., Zeeuwen, P.L.J.M., Hayday, A., Burden, a D., Griffiths, C.E.M., Kere, J., Reis, A., McVean, G., Evans, D.M., Brown, M.A., Barker, J.N., Peltonen, L., Donnelly, P., Trembath, R.C., (2010). A genome-wide association study identifies new psoriasis susceptibility loci and an interaction between HLA-C and ERAP1. *Nat. Genet.* **42**, 985–990.
- Sun, L.-D., Cheng, H., Wang, Z.-X., Zhang, A.-P., Wang, P.-G., Xu, J.-H., Zhu, Q.-X., Zhou, H.-S., Ellinghaus, E., Zhang, F.-Y.F.-R., Pu, X.-M., Yang, X.-Q., Zhang, J.-Z., Xu, A.-E., Wu, R.-N., Xu, L.-M., Peng, L., Helms, C. a, Ren, Y.-Q., Zhang, C.C., Zhang, S.-M., Nair, R.P., Wang, H.-Y., Lin, G.-S., Stuart, P.E., Fan, X., Chen, G., Tejasvi, T., Li, P., Zhu, J., Li, Z.-M., Ge, H.-M., Weichenthal, M., Ye, W.-Z., Shen, S.-K., Yang, B.-Q., Sun, Y.-Y., Li, S.-S., Lin, Y., Jiang, J.-H., Li, C.-T., Chen, R.-X., Cheng, J., Jiang, X., Zhang, P., Song, W.-M., Tang, J., Zhang, H.-Q., Cui, J., Zhang, L.-J., Tang, B., Huang, F., Qin, Q., Pei, X.-P., Zhou, A.-M., Shao, L.-M., Liu, J.-L.J.-J., Du, W.-D., Franke, A., Bowcock, A.M., Elder, J.T., Yang, S., Zhang, X.-J., (2010). Association analyses identify six new psoriasis susceptibility loci in the Chinese population. *Nat. Genet.* **42**, 1005–1009.
- Tanioka, T., Hattori, A., Masuda, S., Nomura, Y., Nakayama, H., Mizutani, S., Tsujimoto, M., (2003). Human leukocyte-derived arginine aminopeptidase. The third member of the oxytocinase subfamily of aminopeptidases. *J. Biol. Chem.* **278**, 32275–32283.
- Van Endert, P., Riganelli, D., Greco, G., Fleischhauer, K., Sidney, J., Sette, A., Bach, J.F., (1995). The peptide-binding motif for the human transporter associated with antigen processing. *J. Exp. Med.* **182**, 1883–95.
- Van Endert, P., Tampé, R., Meyer, T.H., Tisch, R., Bach, J.F., McDevitt, H.O., Endert, P.M. Van, Tamp, R., (1994). A sequential model for peptide binding and transport by the transporters associated with antigen processing. *Immunity* **1**, 491–500.
- Wang, F., Mei, Z., Qi, Y., Yan, C., Hu, Q., Wang, J., Shi, Y., (2011). Structure and mechanism of the hexameric MecA-ClpC molecular machine. *Nature* **471**, 331–335.
- Wearsch, P.A., Cresswell, P., (2008). The quality control of MHC class I peptide loading. *Curr. Opin. Cell Biol.* **20**, 624–631.
- Wearsch, P.A., Jakob, C. a, Vallin, A., Dwek, R.A., Rudd, P.M., Cresswell, P., (2004). Major histocompatibility complex class I molecules expressed with monoglucosylated N-linked glycans bind calreticulin independently of their assembly status. *J. Biol. Chem.* **279**, 25112–25121.

- Williams, A.P., Peh, C.A., Purcell, A.W., Mccluskey, J., Elliott, T., (2002). Optimization of the MHC class I peptide cargo is dependent on tapasin. *Immunity* **16**, 509–520.
- Yang, Q., Liu, H., Qu, L., Fu, X., Yu, Y., Yu, G., Tian, H., Sun, D., Peng, J., Bao, F., Yuan, C., Lu, N., Li, J., Zhang, Y., Zhang, F., (2012). Investigation of 20 non-HLA psoriasis susceptibility loci in Chinese patients with psoriatic arthritis and psoriasis vulgaris. *Br. J. Dermatol.*
- York, I. a, Chang, S.-C., Saric, T., Keys, J.A., Favreau, J.M., Goldberg, A.L., Rock, K.L., (2002). The ER aminopeptidase ERAP1 enhances or limits antigen presentation by trimming epitopes to 8-9 residues. *Nat. Immunol.* **3**, 1177–1184.
- York, I.A., Mo, A.X.Y., Lemerise, K., Zeng, W., Shen, Y., Abraham, C.R., Saric, T., Goldberg, A.L., Rock, K.L., (2003). The cytosolic endopeptidase, thimet oligopeptidase, destroys antigenic peptides and limits the extent of MHC class I antigen presentation. *Immunity* **18**, 429–40.
- Zemmour, J., Little, A.M., Schendel, D.J., Parham, P., Schendel, J., (1992). The HLA-A,B “negative” mutant cell line C1R expresses a novel HLA-B35 allele, which also has a point mutation in the translation initiation codon. *J. Immunol.* **148**, 1941–1948.
- Zervoudi, E., Papakyriakou, A., Georgiadou, D., Evnouchidou, I., Gajda, A., Poreba, M., Salvesen, G.S., Drag, M., Hattori, A., Swevers, L., Vourloumis, D., Stratikos, E., (2011). Probing the S1 specificity pocket of the aminopeptidases that generate antigenic peptides. *Biochem. J.* **435**, 411–420.
- Zhong, G., Liu, L., Fan, T., Fan, P., Ji, H., (2000). Degradation of transcription factor RFX5 during the inhibition of both constitutive and interferon gamma-inducible major histocompatibility complex class I expression in chlamydia-infected cells. *J. Exp. Med.* **191**, 1525–1534.



*Publicaciones generadas  
de esta tesis*

***Anexo I***



- Alvarez-Navarro, C.,** Cragolini, J.J., Dos Santos, H.G., Barnea, E., Admon, A., Morreale, A., López de Castro, J.A., (2013). Novel HLA-B27-restricted epitopes from *Chlamydia trachomatis* generated upon endogenous processing of bacterial proteins suggest a role of molecular mimicry in reactive arthritis. *J. Biol. Chem.* **288**, 25810–25.
- Alvarez-Navarro, C.,** López de Castro, J.A., (2013). ERAP1 in ankylosing spondylitis: genetics, biology and pathogenetic role. *Curr. Opin. Rheumatol.* **25**, 419–425.
- Alvarez-Navarro, C.,** López de Castro, J.A., (2014). ERAP1 structure, function and pathogenetic role in ankylosing spondylitis and other MHC-associated diseases. *Mol. Immunol.* **57**, 12–21.
- Alvarez-Navarro, C.,** Martín-Esteban, A., Barnea, E., Admon, A., López de Castro, J.A., (2015). ERAP1 polymorphism relevant to inflammatory disease shapes the peptidome of the birdshot chorioretinopathy-associated HLA-A\*29:02 antigen. *Enviado.*





- García-Medel, N., Sanz-Bravo, A., Van Nguyen, D., Galocha, B., Gómez-Molina, P., Martín-Esteban, A., **Alvarez-Navarro, C.**, López de Castro, J.A., (2012). Functional Interaction of the Ankylosing Spondylitis-associated Endoplasmic Reticulum Aminopeptidase 1 Polymorphism and HLA-B27 in Vivo. *Mol. Cell. Proteomics* **11**, 1416–1429.
- García-Medel, N., Sanz-Bravo, A., **Alvarez-Navarro, C.**, Gómez-Molina, P., Barnea, E., Marcilla, M., Admon, A., López de Castro, J.A., (2014). Peptide Handling by HLA-B27 Subtypes Influences Their Biological Behavior, Association with Ankylosing Spondylitis and Susceptibility to Endoplasmic Reticulum Aminopeptidase 1 (ERAP1). *Mol. Cell. Proteomics* **13**, 3367–80.
- Barriga, A., **Alvarez-Navarro, C.**, Lorente, E., Mir, C., David, CS., López de Castro, JA., López, D. (2015). Antigenic mimicry between HLA-B\*27 ligands from Chlamydia trachomatis and humans. *Enviado*.

